

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

BAND XLIV, HEFT 4 (SCHLUSHEFT)

MIT 33 TEXTABBILDUNGEN

ABGESCHLOSSEN AM 17. FEBRUAR 1965



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1955

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einem berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertstraße 61, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,
(Sa) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5
Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10%, der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Besitzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLIV. Band

Inhaltsverzeichnis

4. Heft

Abhandlungen

Seite

Heilbrunn, L. V., and W. L. Wilson: The Initiation of Cell Division in the <i>Chaetopterus</i> Egg	377
Ziegenspeck, H.: Das Vorkommen von Fila in radialer Anordnung in den Schließzellen	385
Mayr, H. H.: Zur Kenntnis des osmotischen Verhaltens von Getreidewurzeln	389
Flasch, Assunta: Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen	412
Schaefer, G.: Ein Versuch zur quantitativen Auswertung der Plasmolyseform- und -zeitmethode	422
Thaler, Irma: Die Leukoplasten von <i>Helleborus</i>	437

Sammelreferat

Nagai, S.: The Reduction of Silver Nitrate by Plant Cells, Particularly by Chloroplasts	444
---------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

The Initiation of Cell Division in the *Chaetopterus* Egg¹

By

L. V. Heilbrunn

Department of Zoology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania,
and the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts

and

W. L. Wilson

Department of Physiology and Biophysics, College of Medicine, University of
Vermont, Burlington, Vermont, and the Marine Biological Laboratory, Woods Hole,
Massachusetts

(Received October 28, 1954)

Basic to an understanding of the cancer problem is a knowledge of what makes cells divide and what prevents them from dividing. No amount of talk about somatic mutations, no purely morphological studies of the chromosomes of cancer cells can explain why it is that cells in the brain or liver or other organs begin to divide and form tumors when normally they rarely if ever show any signs of division. What induces these cells to divide? In other words, what explanation can we give of the stimulus to mitosis?

For the most part, those who have attempted to attack this problem have studied either the induction of tumors in animals like rats or mice, or they have done experiments on marine eggs. In both types of work, it was at first felt that only certain specific chemicals could induce cells to divide, but later it was shown over and over again that extremely diverse types of chemical substances and also various types of physical treatment could be effective. Could it be possible that all these diverse agents had a specific effect on the cell protoplasm? Older theories had held that the initiation of cell division was due to an increase in the rate of protoplasmic oxidation, or that it was due to an increase in the permeability of the plasma membrane of the cell. These older ideas have been shown definitely and decisively to be wrong (for discussion, see Heil-

¹ This investigation was supported by a research grant from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, Public Health Service.

brunn 1952a, 1952b). The only theory that at present seems to have any chance of success is a theory that interprets the initiation of mitosis in terms of the protoplasmic colloid. When an egg cell is stimulated to divide, there is a release of calcium from the cortex of the cell and this calcium entering the cell interior causes there a clotting or gelation which results in the formation of the mitotic spindle. Much evidence has been presented in favor of this theory and this evidence is summarized in the publications cited above. For the egg of the worm *Chaetopterus*, it has been clearly shown that all of the many types of agents that can induce cell division produce decrease in the rigidity of the cortex of the cell, an effect which is almost certainly to be associated with a release of calcium from the cortex. Such agents include hypertonic solutions, isotonic potassium chloride, cold, heat, acids, alkalies, fat solvents, and ultraviolet radiation. It is the purpose of this paper to show that these agents, obviously so different in nature, all cause a sharp increase in the viscosity of the protoplasm in the interior of the *Chaetopterus* egg, a viscosity increase which presumably represents, or is responsible for, the mitotic gelation.

Methods

All of the experimental work was done on eggs of the annelid worm *Chaetopterus pergamentaceus*. The worms were obtained in the vicinity of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts. The methods used were essentially the same as those described in previous papers on the *Chaetopterus* egg, see especially Heilbrunn and Wilson (1948). However the centrifuge used was not an Emerson hand centrifuge, but one of a similar type². When the handle of the centrifuge was turned once every two seconds, a centrifugal force of approximately 2400 times gravity was developed. In measuring protoplasmic viscosity, we determined the number of seconds required to move the lighter, fatty particles of the protoplasm to one end of the egg and the heavier granules to the opposite end. The end point was taken as the number of seconds just necessary to make visible three distinct regions of the protoplasm. This number of seconds is the "viscosity value," and it is an arbitrary number. We have no certain information as to the absolute value of the viscosity of *Chaetopterus* protoplasm, but from data on other marine eggs, it is probable that our arbitrary viscosity values represent units of approximately half a centipoise, so that when we record a value of 8, the absolute viscosity value in centipoises is approximately 4. The normal viscosity of unfertilized *Chaetopterus* egg protoplasm in arbitrary units is approximately 7.

In determining percentages of cleavage, one cannot always be sure that an egg which is divided into two or more cells has actually gone through

² This was made for us by Mr. J. A. Appenzeller of the Zoology Department of the University of Pennsylvania. Mr. Appenzeller constructed a suitable head for a hand cream separator purchased from Sears and Roebuck. The radius of turn of the centrifuge head was 8 cm.

processes of mitosis. No great accuracy can therefore be claimed for the counts of cell division. However, it is clear that the mitotic-inducing agents that we used did actually cause high percentages of cell division. Moreover, in many cases the eggs thus induced to begin their parthenogenetic development went on to produce swimming larvae.

Results

In reporting our results we shall not attempt to record all the experiments we performed. In experiments on marine eggs, slight differences in experimental procedure can produce very different results. Eggs which under a given set of conditions will show a rather high percentage of cleavage, will under slightly different conditions show little or no cleavage. Sometimes, too, the condition of the eggs is a deciding factor. Apparently it is necessary to produce just enough of an effect on the protoplasm; a little too much and the eggs may die without dividing. Hence we were concerned mostly with finding just the right concentration or intensity of a stimulating agent and the proper exposure time necessary to produce a relatively high percentage of divisions. Then, following such treatment and well before the eggs divided, we sought to discover whether or not the protoplasm in the interior of the eggs showed any marked change in viscosity. Because the results obtained were consistent, we did not try to multiply our experiments, and we were usually content with only a few repetitions. In what follows, we will cite only representative experiments. It should perhaps be noted that when *Chaetopterus* eggs are allowed to stand for a long time in sea water, many of the eggs show abnormal divisions. Indeed the *Chaetopterus* egg has a strong tendency to be naturally parthenogenetic, a fact which is to be correlated with the observation that in aging *Chaetopterus* eggs the cortex tends to liquefy (Wilson and Heilbrunn 1953). Obviously, in all studies of the initiation of mitosis in *Chaetopterus*, counts of controls must be made, and unless an agent is successful in initiating cell division in a few hours, no certain conclusions can be drawn.

Hypertonic solutions. In Loeb's original studies on the *Chaetopterus* egg (Loeb 1901), he found that the most successful of all the parthenogenetic agents that he tried were hypertonic solutions. In our earlier work (Wilson and Heilbrunn 1952), we also found such solutions very effective. Hypertonic solutions have a very marked effect on the viscosity of the protoplasm in the interior of *Chaetopterus* eggs. Thus when eggs were placed in a solution containing 85 ml. of sea water plus 15 ml. of 2.5 molar NaCl, the viscosity of the interior protoplasm rose in 10 minutes from a value of 8 to a value slightly above 60. A little later, the viscosity was found to be 70. But it never rose above this value, and indeed with the passage of time, the viscosity seemed to become slightly lower. When, after varying lengths of exposure to the hypertonic solution (10-80 min.) the eggs were returned to sea water, the protoplasm soon became very fluid again, with a viscosity of about 7. Cleavages were

fewer in this experiment than is usual after exposure to hypertonic solutions. Exposures of 10, 20, 40, 60, 80 minutes gave 0, 2, 3, 6, 23% cleavage respectively.

Isotonic KCl solutions. These solutions of potassium chloride are excellent parthenogenetic agents. In one experiment, we washed the eggs 3 times in a solution of 0.53 molar KCl, and then observed the effect of the solution on protoplasmic viscosity. The washing operation required 10 minutes. A viscosity test made 28 minutes after the first immersion in the solution showed a viscosity of well over 40, as compared with a control value of 8. Eggs were exposed to the KCl solution for 35, 50, 65, and 90 minutes, and four hours after the time of first immersion in the solution they showed cleavage counts of 42, 27, 38, and 10% respectively. At the same time, the control eggs, which had remained in sea water, showed only 1% cleavage.

Cold. In our experiments, we did not find cold to be a very effective agent in initiating cell division. However, in one case, we found that eggs exposed for 1 minute to a temperature of -1°C . and then transferred to sea water at 21°C . showed the next day 44% cleavage as compared with 5% cleavage in the control eggs which had stayed at a temperature of 21°C . Moreover, 22% of the eggs thus exposed to cold for 1 minute developed into swimming larvae; none of the control eggs developed into swimming larvae. Longer exposures were not so successful. Thus when eggs were exposed 2 minutes to -1°C ., although 52% cleaved, only 1% formed swimming larvae, and no swimmers were produced at all when the eggs were exposed for 4 and for 10 minutes. It is difficult to make viscosity tests of eggs in the cold, for the process of centrifuging soon raises the temperature. However, there does appear to be an increase in protoplasmic viscosity when eggs are exposed to temperatures of -1°C . At any rate, after the eggs are removed from the cold, many of them show a high level of viscosity in the interior. Thus in another experiment in which eggs were exposed to 0°C . for 1 and 2 minutes, after return of the eggs to a temperature of 21°C ., 28% of the eggs exposed for 1 minute showed a viscosity of 12 or above; tests were completed 19 minutes after eggs had been taken from the cold. Control eggs (at 21°) all had a viscosity of 8.

Heat. Brief exposures to heat can cause rather a high percentage of eggs to divide. We tried temperatures from 39° to 45°C ., exposing the eggs for periods of 1 and 2 minutes. The eggs were pipetted into dishes containing the warm sea water, and then at the end of the exposure period, they were returned to sea water at room temperature. We found that temperatures of 43° and above were too high and temperatures of 39° and below were too low to cause any high percentage of initiation of division. The table shows an experiment in which the eggs were exposed to temperatures of 42° , 41° , and 40° .

The viscosity of these eggs was tested some minutes after the eggs were removed from exposure to the heat. In general, many or indeed most, of the eggs showed a definite increase in viscosity. Thus 90% of the eggs

exposed to 42° for 1 minute showed a viscosity well above 8; the test was made 29 minutes after they had been placed in hot sea water. Similarly, of those exposed for 2 minutes to the same temperature, 98% showed a definite increase in protoplasmic viscosity. Of the eggs exposed to 40° for 1 minute, 50% showed a definite increase in protoplasmic viscosity. How high the viscosity rose in these eggs is not certain, although the results

Percent of cleavage following exposure to heat

Exposure temperature	42°	41°	40°	Control
1 min. exposure	33	71	6	0
2 min. exposure	52	10	72	

of another experiment indicate that the rise may have been considerable. It is thus clear that exposure to temperatures which cause initiation of cleavage is indeed followed by an increase in the viscosity of the protoplasm in the interior of the egg cell.

Acid. To 500 ml. of sea water, 12 ml. of 0.1 *n* HCl were added. The mixture was kept for 2 days in a large fingerbowl so as to allow carbon dioxide to escape. The pH of the solution was then found to be 4.40. Eggs were placed in this acid sea water, and then at various times, the protoplasmic viscosity of these eggs was compared with that of the control eggs. At the beginning, both sets of eggs had a viscosity of approximately 6, but after 16 minutes of exposure, 46% of the eggs in the acid solution showed a viscosity above 8; and at 41 minutes, this percentage had risen to 80%. The viscosity of the control eggs remained low. Some eggs were removed from the acid solution after an exposure of 34 minutes. Six hours later, a cleavage count showed that 49% of these eggs had divided; the control eggs counted at the same time showed no divisions. A small percentage of the eggs exposed to acid produced swimming larvae.

Alkali. In our rather limited experience, addition of small amounts of alkali had no effect in causing initiation of cell division. On the other hand, if a sufficient amount of alkali was added so that the solution was able to act as a parthenogenetic agent, the concentration of alkali was sufficient to cause a precipitation of calcium and magnesium hydroxides. Hence, the effect obtained may not have been due to the hydroxyl ion. Exposure to sea water to which sufficient NaOH had been added to raise the pH to 10.0, caused the viscosity of the protoplasm to rise in some of the eggs. Thus, 12% of these eggs showed a viscosity above 8, 7% a viscosity above 12, and 3% a viscosity above 20. It is possible that various eggs of a given lot showed viscosity increases at different times. In order to obtain divisions, long exposures to the alkaline solutions were necessary. Eggs left in the solution for 5 hours showed 62% cleavage; this is to be compared with 22% cleavage in the controls.

Ether. Eggs were exposed in closed vessels to a solution of 2% ether (by volume) in sea water, and they were removed from this solution and returned to normal sea water after exposure of 12, 57 and 86 minutes. A centrifuge test made after the eggs had been exposed to ether for

25½ minutes showed that in 32% of the eggs so exposed the protoplasmic viscosity had risen to a value above 8, although the control eggs in sea water had a viscosity of 8 or below. After several hours, the eggs exposed only 12 minutes showed 56% cleavage, and those exposed for 86 minutes showed 65% cleavage. The next day, of the eggs exposed 57 and 86 minutes, 8 and 13% respectively had developed into swimming larvae; there were no swimming larvae among the eggs exposed 12 minutes.

Ultraviolet radiation. As in our previous work (Wilson and Heilbrunn 1952), we used a Uviarc lamp, and the same technique was employed. Exposure for 1 minute to the rays from this lamp (at a target distance of 9.5 cm.) had little effect in causing the eggs to divide. However a 2 minute exposure caused 37% cleavage in one experiment and 45% cleavage in another. Many of the eggs showed a definite increase in protoplasmic viscosity. Thus, at 3½ hours after exposure, 76% of the eggs exposed for 2 minutes showed a viscosity above 6; although the control eggs had a viscosity of 6 or below. A little later, another test showed that 55% of these eggs exposed for 2 minutes had a viscosity above 8, 12% had a viscosity above 10, and 7% had a viscosity above 12. Thus clearly enough, exposure to ultraviolet radiation sufficient to cause initiation of cell division also causes many of the eggs to show a marked increase in protoplasmic viscosity.

Discussion

Any reasonably complete theory of cell division must offer an explanation of why it is that so many different kinds of agents all can make a cell divide.

Of the older theories, none was able to do this. Thus Loeb was never able to prove that the various treatments that made marine eggs divide all caused an increase in oxidation; indeed his few attempts to show that parthenogenetic agents did cause an increase in oxygen uptake were marred by the fact that he made an improper use of Winkler's method of determining oxygen in solution (compare Heilbrunn 1915). Not all agents which incite cells to divide cause an increase in permeability (see Heilbrunn 1952b). Some authors have attempted to explain cell division as due to an increase in the viscosity or rigidity of the cortex. Thus Marsland (1939) believes that his experiments "give strong support to the view (Marsland 1938) that a gelation of the cortex of the egg, especially in the equatorial region where the furrow will form plays an important role in the mechanism of cell division." Marsland found that pressure prevented cell division but he seems to be unaware of the well known fact that pressure causes a disappearance of the mitotic spindle as well as a liquefaction of the cortex. Also Marsland believed he was able to show that at cell division the cortex of sea urchin eggs became more rigid, but in his measurements he studied the movement of granules which in large measure are not in the region he was supposed to be measuring. His work has been strongly criticized (see especially

Wilson 1952), and Marsland himself now admits (Marsland and Landau 1954) that Wilson is correct in his clear demonstration that in the *Chaetopterus* egg the cortical rigidity does not increase at cell division. Moreover neither Marsland nor anybody else has ever attempted to demonstrate that all the agents which make a cell divide cause an increase in the rigidity of the cortex. Indeed for the *Chaetopterus* egg the exact opposite is true (Wilson and Heilbrunn 1952).

The work presented here is a continuation of our earlier work. Previously we reported that all the agents that caused a *Chaetopterus* egg to divide caused a liquefaction of the cortex; this presumably involves a release of calcium. The released calcium should produce a clotting and an increase in the viscosity of the interior protoplasm. This now we have been able to demonstrate. Thus we can now state that:

1. Agents which induce division in the *Chaetopterus* egg liquefy the cortex and can be presumed to release calcium ions to the cell interior.
2. This causes a viscosity increase in the interior protoplasm.
3. The viscosity increase and also the division of the cell is prevented by anti-clotting agents such as heparin and related compounds (Heilbrunn and Wilson 1949, 1950; Heilbrunn, Wilson and Harding 1951; Heilbrunn, Chaet, Dunn and Wilson 1954).

Together these facts lend broad support to the theory that the initiation of mitosis is due to a clotting reaction initiated by the release of calcium from the cortex of the cell.

Summary

The various agents which can cause the initiation of cell division in the egg of the worm *Chaetopterus* all cause an increase in the viscosity of the interior protoplasm. These agents include hypertonic solutions, isotonic potassium chloride solutions, cold, heat, acid, alkali, ether and ultra-violet radiation.

Literature

- Heilbrunn, L. V., 1915: The measurement of oxidation in the sea-urchin egg. *Science* 42, 415—416.
- 1952 a: The physiology of cell division. In: *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*. Academic Press. New York, pp. 123—134.
 - 1952 b: An outline of general physiology. 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
 - A. B. Chaet, A. Dunn and W. L. Wilson, 1954: Antimitotic substances from ovaries. *Biol. Bull.* 106, 158—168.
 - and W. L. Wilson, 1948: Protoplasmic viscosity changes during mitosis in the egg of *Chaetopterus*. *Biol. Bull.* 95, 57—68.
 - — 1949: The effect of heparin on cell division. *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.)* 70, 179—182.
 - — 1950: The prevention of cell division by anti-clotting agents. *Protoplasma* 39, 389—399.
 - — and D. Harding, 1951: The action of tissue extracts on cell division. *J. nat. Cancer Inst.* 11, 1287—1298.

- Loeb, J., 1901: Experiments on artificial parthenogenesis in annelids (*Chaetopterus*) and the nature of the process of fertilization. *Amer. J. Physiol.* 4, 423—459.
- Marsland, D. A., 1938: The effects of high hydrostatic pressure upon cell division in *Arbacia*. *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 12, 57—70.
- 1939: The mechanism of cell division. Hydrostatic pressure effects upon dividing egg cells. *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 13, 15—22.
- and J. V. Landau, 1954: The mechanism of cytokinesis: Temperature pressure studies on the cortical gel system in various marine eggs. *J. exper. Zool.* 125, 507—539.
- Wilson, W. L., 1951: The rigidity of the cell cortex during cell division. *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 28, 409—415.
- and L. V. Heilbrunn, 1952: The protoplasmic cortex in relation to stimulation. *Biol. Bull.* 103, 139—144.
- — 1953: Colloidal changes during aging of the *Chaetopterus* egg. *Biol. Bull.* 105, 388—389.

Das Vorkommen von Fila in radialer Anordnung in den Schließzellen

Von

A. Ziegenspeck

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 16. August 1954)

Durch die Untersuchung mit dem Polarisationsmikroskop, also mit den Kompensatoren und dem Farbdichroismus, ist eine Anordnung der feinsten Teilchen (Micelle) der Zellmembran in radialer Richtung (die Radiomicellierung) seit längerer Zeit aufgefunden (Ziegenspeck 1934, 38, 39). Das gilt für die Stomata mit keilförmigen Verdickungen asymmetrischer Natur ebenso wie für diejenigen, denen eine solche fehlt. Nur ein Teil der symmetrischen Verdickungen (Gramineen und Coniferen) hat in den sekundären Verdickungen tangential Anordnung zum Spalt, bei anderen (*Cyperaceae*, *Cycadaceae*) sind auch diese radiomicellat. Jedoch bei Fehlen der radialen Anordnung in den symmetrischen Verdickungen sind die Endkeile immer radialkeilig micelliert. Auf Grund dieser submikroskopischen Gestaltung wurde der Gegenmicelldehnungssatz aufgestellt, welcher besagt, daß senkrecht zur Micellierung die Dehnbarkeit der Wand am größten ist. Die schönen Bilder sind als Farbmikrophotogramme (Ziegenspeck 1954) veröffentlicht. Zur Demonstration eignet sich besonders die Farbdichroskopie mit substantiven Farben, z. B. Benzoazurin, weil die Mikroprojektion leicht mit aufgesetzter Polplatte die Wanderung der allein gefärbten Zone beim Drehen der Platte projizieren läßt. [Vorträge in der Bayr. bot. Gesellschaft 1935, 1952, Botaniker-Kongreß in Paris 1954.]

Gegen Aufstellung einer Radiomicellierung auf Grund dieser Methoden könnte nun der Einwand erhoben werden, daß die Anordnung nur erschlossen, nicht unmittelbar zu sehen sei. In letzter Zeit ist durch die Elektronenmikroskopie, zumal mit dem Matrizenverfahren, aufgezeigt worden, daß der Aufbau etwas komplizierter ist.

Man erkennt damit, daß die Zellulosemembranen aus einem meist wenig verschlungenen Geflecht von Mikrofibrillen aufgebaut ist. Diese Mikrofibrillen sind, besonders günstige Verhältnisse vorausgesetzt, mit den stärksten lichtoptischen Vergrößerungen (numerische Appertur!) gerade noch auflösbar. Man muß zumeist Verquellung und Anfärben mit dichroit-

schen Farbstoffen, Dunkelfeld, Phasenkontrast und das Polarisationsmikroskop anwenden (Ziegenspeck 1951, 1952, 1953). In selteneren Fällen vereinigen sich die Mikrofibrillen zu größeren Verbänden (Fila), welche auf diesen Wegen sicher nachzuweisen sind.

Die erste Arbeit, welche die Methodik des Elma auf die Stomata angewandt hat, ist die von Volz (1952). Sie konnte deutlich die radiale Anordnung in den Schließzellen und die antagonistische, also tangential, in den Nachbarzellen erkennen. Gerade in unserem Falle stößt jedoch die Anwendung des Matrizenverfahrens auf Schwierigkeiten, weil die Schließzellen außen und innen von Kutikula bedeckt sind. Diese hat eine andere Anordnung und Elastizität als die Zellulosemembranen. Jedoch gerade sie kommt beim Bedampfen mit Silizium und Edelmetallen etc. zum Vorschein. Eine Kopie der Aufnahme ist von mir (Ziegenspeck 1954) übernommen worden. Da mit dem Verfahren der verfeinerten Lichtmikroskopie an anderen Objekten mit Erfolg die Fila und vielleicht auch Mikrofibrillen nachgewiesen werden konnten (Ziegenspeck), so lag es nahe, diese Verfahren auf die Stomata anzuwenden. Bereits von Porsch (1905) sind Abbildungen veröffentlicht, die ohne Deutung eine radiale Streifung in den übergroßen Schließzellen von *Bomonia spectabilis* aufzeigen. Ähnliche Dinge kann man auch bei *Stangeria* gewahren. Solche Abbildungen muß man jedoch mit gewisser Vorsicht deuten, weil vielfach die Streifung in der Kutikula liegt (*Sarracenia*, *Darlingtonia*) und nicht in der Zellulosemembran. Besonders günstig für die Untersuchung

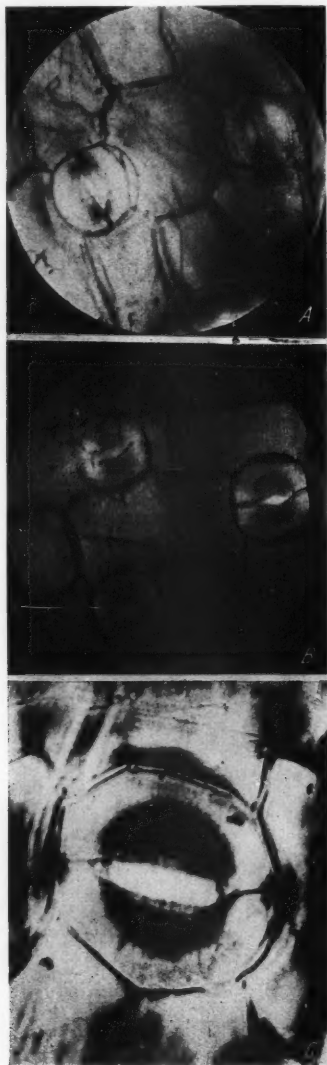


Abb. 1. Stomata von *Orchis maculata* (A und B); *Listera ovata* (C), Unterseite dichroitische Färbung mit Benzoazurin. Der Pfeil gibt die Schwingungsrichtung des Nicols an, in der die Färbung positiv ist. A und B mit Leitz 6×10 , C mit 8×10 aufgenommen. Während in A und B nur die Summe der Wirkung der Fila und Mikrofibrillen als Schatten erscheint, ermöglicht die größere Tiefenschärfe in C die Auflösung in Fila.

war *Ophioderma (Ophioglossum) pendulum*, das ich von Prof. Degener aus Hawai und vom Museum Buffon aus Paris von den Sandwichinseln bekam. Es ließ sich mit allen Methoden die radiale Stellung der Fila (Radiofilierung) nachweisen und mikrophotographieren. Hiebei leistete die Farbmikrophotographie sehr gute Dienste. Die Farbbilder sind veröffentlicht

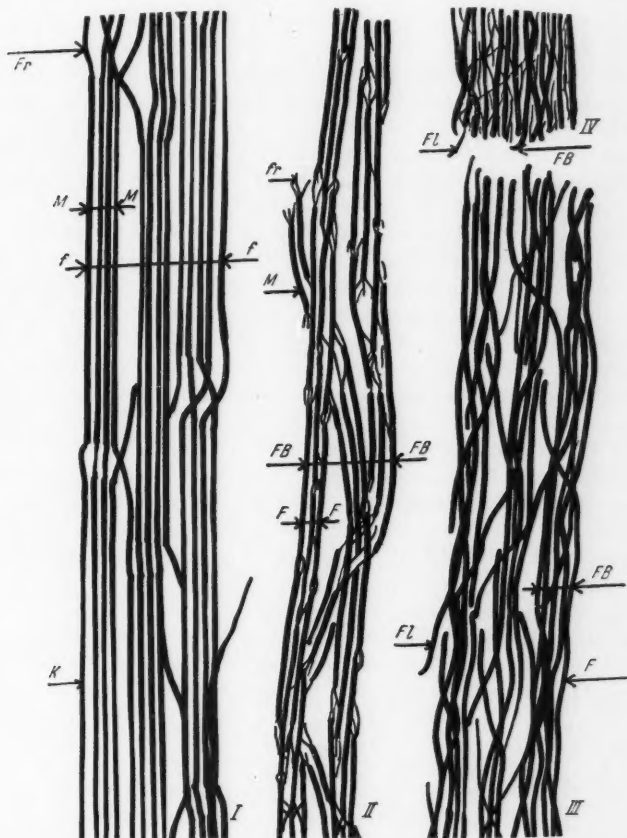


Abb. 2. Moderne Ansichten über den Aufbau der Zellulosewände.
 I. Die Striche sind die Makromoleküle F = Fransen, K = kristallisierte Bereiche, die sich zu Micellen (M) zusammenlegen. Die Micelle samt Fransen vereinigen sich zu Mikrofibrillen (F). Aus Röntgen erschlossen.
 II. Schwächer vergrößert. Die dicken Striche Micelle (M); diese legen sich zu Mikrofibrillen zusammen (F). Letztere vereinigen sich zu Fila (FB). Nach Quellung mit dem Elma gerade die Micelle bzw. Komplexe erkennbar.
 III. Bild des Elma-Fila (FB). FL nicht zu Komplexen vereinigte Mikrofibrillen.
 IV. Bild der verfeinerten Lichtoptik.

(Ziegenspeck 1954). Bedeutend schwieriger war es, ähnliche Filierung bei verwandten *Botrychiaceae*, *Ophioglossaceae* und *Cycadaceae* nachzuweisen. Nun sind diese Familien in vieler Hinsicht ancestral und fallen auch sonst aus dem Rahmen der anderen Pflanzenwelt, so daß man von einem Ausnahmefall reden könnte.

Ich war daher bestrebt, bei anderen Pflanzen mit ausnehmend großen Schließzellen eine Radiofilierung zu sehen und zu mikrophotographieren. Die Methode derselben ist die Verwendung von Objektiven schwächerer Vergrößerung, aber möglichst hoher numerischer Appertur, also Auflösung, weil sie große Tiefenschärfe haben. Mit den landläufigen Immersionen kann man wohl diese Dinge erkennen, doch an ein Aufnehmen wegen der mangelnden Tiefenschärfe nicht denken. Wir haben mit 1/7 Fluorit-Immersion oder gar mit Immersion 8 mm von Leitz gute Erfahrungen gemacht. Als ein günstiges Objekt erwies sich die Blattunterseite von *Listera ovata*. Wir geben eine Photographie einer günstigen Stelle bei (Abb. 1 C). Da wir besonders intensive und tiefe Färbung erzielen wollten, haben wir das von W. O. Ostwald seinerzeit angeratene Verfahren verwendet. Die metachromatischen Farben, wie Benzoazurin, haben tiefe Töne in den groben Teilen. Diese sind in kaltem Wasser schwer löslich. Beim Aufkochen der Lösung schlägt die blauviolette Farbe in rotviolette um. Man übergießt die sorgfältig aufgehellten und ausgewaschenen Abzüge mit heißer Farblösung, läßt erkalten und etwa 12 Stunden stehen. Durch Auswaschen in destilliertem Wasser und Fixieren des rechten Farbtönen mit kalkhaltigem Wasser und Überführen in Euparal kann man sehr gute Präparate erzielen. Die Einbettung in Caedax, Balsam etc. ist weniger zu empfehlen, da die völlige Entwässerung und Erzeugung einer labilen Imbibition eine Entquellung hervorruft und die Mikrofibrillen und Fila zu sehr einander genähert werden.

Indem ich auf das Mikrophotogramm dieser Arbeit und auf die in der zitierten Arbeit verweise, betone ich, daß durch den Nachweis leicht sichtbarer Fila in radialer Anordnung, die Radiomicellierung und damit der Gegenmicelldehnungssatz ein neues Glied der Beweiskette erhalten haben.

Literatur

- Porsch, O., 1905: Der Spaltöffnungsapparat im Lichte der Phylogenie. Jena.
 Volz, G., 1952: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Porengröße pflanzlicher Zellwände. *Mikroskopie* 7, 251—265.
 Ziegenspeck, H., 1934: *Orchidaceae* in Kirchner-Löw-Schröter. Lief. 47/48.
 — 1938: Spaltöffnungen. *Mez-Archiv* 39, 268.
 — 1951: Der submikroskopische Bau des Holzes im Vergleich mit dem der Fasern im allgemeinen. *Freund, Handbuch Mikroskopie und Technik* VI, 371—450.
 — und H., 1952: Die Wandungen von *Cladophora glomerata* im Lichte der verfeinerten Methoden der Lichtmikroskopie. *Protoplasma* 41, 15—20.
 — 1954: Die Farbenmikrophotographie, ein Hilfsmittel zum objektiven Festhalten submikroskopischer Strukturelemente. Die Radiomicellierung und Filierung der Schließzellen von *Ophioderma pendulum*. Photographie u. Wissenschaft, Heft 4.

Zur Kenntnis des osmotischen Verhaltens von Getreidewurzeln

Von

Hubert H. Mayr

Aus dem Biologischen Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke Aktiengesellschaft. Leiter: Priv.-Doz. Dr. Hans Linser

Mit 9 Textabbildungen

(Eingelangt am 30. September 1954)

Einleitung

Die Versuche zur Erfassung der Gesetzmäßigkeiten, welche das Pflanzenwachstum und damit die Ertragsbildung beherrschen, reichen zurück bis zum Begründer der Agrikulturchemie Justus von Liebig. Seine grundlegenden Arbeiten auf dem Gebiete der Pflanzenernährung begründeten nicht nur die moderne Düngelehre sondern führten auch zum sogenannten „Gesetz des Minimums“, welches besagt, daß der am wenigsten verfügbare Wachstumsfaktor allein die Höhe des Ertrages bestimme. Erst in neuerer Zeit wurde der beschränkte Anwendungsbereich bzw. die Gültigkeit dieses sogenannten Minimumgesetzes erkannt, und E. A. Mitscherlich (1909, 1928, 1950) konnte in einer großen Anzahl von Gefäßversuchen bei Hafer und verschiedenen anderen Kulturpflanzen eine gesetzmäßige Abhängigkeit des Pflanzenertrages von den verschiedenen Faktoren, welche zum Ertrag führen, nachweisen. Das von B. Baule (1924) mathematisch formulierte Ertragsgesetz, welches als „Wirkungsgesetz der Wachstumsfaktoren“ bekannt ist, hat die Form:

$$\frac{dy}{dx} = c_1 \cdot (A - y) \quad (1)$$

bzw. $y = A \cdot (1 - 10^{-cx})$. (1 a)

Es bedeutet:

x ... Menge des Wachstumsfaktors,

y ... erzielter Ertrag an Pflanzenmasse (Trockensubstanz),

c ... Wirkungsfaktor bzw. Wert des untersuchten Wachstumsfaktors,

$c_1 \dots = 0,434 \cdot c$ (Umrechnung in Briggsche Logarithmen),

A ... theoretischer Höchstertrag von der momentanen Konstellation sämtlicher anderer Wachstumsfaktoren bedingt.

Diese Formulierung stellt einen theoretischen Idealfall dar für einen Wachstumsfaktor, welcher keinerlei schädigende Nebenwirkung zeigt.

Den praktischen Gegebenheiten Rechnung tragend, erweist sich eine Erweiterung als notwendig, und die erweiterte Form des Mitscherlichgesetzes resultiert zu

$$y = A (1 - 10^{-cx}) \cdot 10^{-kx^2} \quad (2)$$

Darin bedeutet:

k ... einen von Pflanzenart und Wachstumsfaktor abhängigen „Schädigungsfaktor“, welcher die Schädigung bei Anwendung höherer Mengen des Wachstumsfaktors in Rechnung stellt,

y, A, c, x ... siehe Erklärung zu (1) bzw. (1a).

Dieses Mitscherlichsche Ertragsgesetz, welches, wie schon erwähnt, empirisch aus einer großen Zahl von Gefäßversuchen abgeleitet wurde, läßt sich, wenn man die modernen Modell-

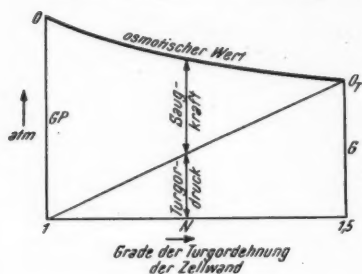


Abb. 1.

OT ... osmotischer Wert der wassergesättigten Zelle,

O ... osmotischer Wert bei Grenzplasmolyse,

GP ... Zustand bei Grenzplasmolyse,

N ... Normalzustand der Zelle,

G ... Zustand der wassergesättigten Zelle.

vorstellungen der Biophysik über die Selbstreproduktion (Th. Neugebauer [1939], K. Sommermeyer [1939], P. Jordan [1944], Friedrich-Freksa [1940, 1948] u. a.) und die Treffertheorie (Rajewsky [1948], Timofeeff-Ressovsky [1949]) heranzieht, auch theoretisch ableiten, wie Linser u. Kaindl (1951) zeigen konnten. Im folgenden werden die Gründe für das Zustandekommen des Schädigungsfaktors einer näheren Betrachtung unterzogen. Während die Schädigungsfaktoren für die Nährstoffe P_2O_5 und K_2O einen sehr kleinen Wert haben und daher in der praktischen Düngere Anwendung wohl nie ihren, das Pflanzenwachstum und damit die Ertragsbildung hemmenden Einfluß zur Geltung bringen, liegen die Verhältnisse beim Wachstumsfaktor Stickstoff ganz

anders. Hier macht sich mit steigenden Nährstoffgaben der verhältnismäßig hohe Schädigungsfaktor wohl bemerkbar, und zwar in einer Verminderung des Ertrages bei steigenden N-Gaben über ein bestimmtes Maß hinaus (es soll hier nur eine ungeteilte Verabreichung der Düngung, also *Stoßdüngung* betrachtet werden). Mitscherlich (1948) führt als Ursache des Schädigungsfaktors für Stickstoff hauptsächlich zwei Gründe an:

Erstens die Eigenschaft des Getreides, bei überhöhten N-Gaben zu „lagern“, ein Vorgang, über dessen Mechanismus bis heute noch wenig bekannt ist, und

zweitens die Möglichkeit, daß hohe Stickstoffgaben hohe osmotische Werte der Bodenlösung bedingen und zu plasmoly-

lytischen Schädigungen der Wurzelzellen führen, woraus eine allgemeine Schädigung der Pflanze durch Störung der Nährstoffaufnahme resultiert.

Es soll hier noch erwähnt werden, daß diese Schädigungsmöglichkeiten umgangen werden können, wenn die N-Gabe nicht auf einmal, sondern in mehreren Teilgaben verabreicht wird (Kopetz [1951], Linser [1952]) und so den Ernährungsbedürfnissen der einzelnen Entwicklungsstadien der Pflanzen durch diese „Stadiendüngung“ (Linser 1953) Rechnung getragen wird.

Das Problem der Schädigung bzw. der Ertragsdepression des Getreides bei zu hohen Stickstoffgaben besitzt große praktische Bedeutung für unsere Ernährung, weil uns hiedurch bei unseren Bestrebungen zur Erzielung von Ertragssteigerungen, wie sie zur Ernährung einer wachsenden Bevölkerung notwendig wären, die Grenzen eng gesteckt sind.

Zur Klärung des Sachverhaltes ist es aber notwendig, über die osmotischen Größen der Wurzelepidermiszellen der Getreide (nur diese wollen wir in den Kreis unserer Betrachtungen einbeziehen) während der ganzen Vegetationsperiode Bescheid zu wissen. Es taucht in diesem Zusammenhang die Frage auf, welche osmotische Größe bzw. welcher Zustand herangezogen werden soll, um das allgemeine osmotische Verhalten der Zellen zu charakterisieren. Dies macht ein kurzes Eingehen auf die osmotischen Zustandsgrößen pflanzlicher Zellen und Gewebe notwendig (Ursprung u. Blum 1916, Höfler 1920, Ursprung 1932, 1939, Walter 1947).

Ohne auf den anatomischen Bau der Zellen näher einzugehen (es sei auf die umfangreiche Literatur Molisch 1936, Walter 1947 u. a. hingewiesen), können die Verhältnisse am besten durch ein Diagramm veranschaulicht werden (Höfler 1920) (Abb. 1).

Dazu sei die osmotische Grundgleichung gebracht (nach Ursprung 1939).

$$S_z = S_i - W$$

S_z ... Saugkraft der Zelle,
 S_i ... Saugkraft des Inhaltes,
 W ... Wanddruck.

Walter (1952) gebraucht noch andere Symbole, er schreibt:

$$S = W - P, \text{ worin } S \dots \text{Saugkraft der Zelle in Atmosphären,}$$

$W \dots$ osmotischer Wert des Zellsaftes in Atmosphären,
 $P \dots$ Turgor- (bzw. Wand-) Druck in Atmosphären.

Dem Diagramm ist zu entnehmen, daß die Saugkraft einer Zelle beim Zustand vollkommener Wassersättigung (G) gleich Null ist, der Turgordruck dabei aber seinen größten Wert hat. Der Turgordruck ändert sich bei Wasserabgabe, sei es durch Welken (Austrocknen) oder durch Einbringen der Zelle in eine hypertotonische Lösung (Plasmolyse) in Richtung Null, während die Saugkraft der Zelle ansteigt. Der osmotische Wert steigt vom Zustand der Wassersättigung ständig an, während der Grad der Turgordehnung der Zellwand bzw. das relative Volumen der Vakuole abnimmt. Wenn der Turgordruck den Wert Null erreicht, haben wir den Zustand der Grenzplasmolyse erreicht, es beginnt die Ablösung des Plasmas von der Zellwand, und damit setzen Vorgänge ein, die irreversibel sein können und zur Schädigung der Zelle führen. Eine pflanzliche Zelle hat also sozusagen einen „osmo-

tischen Lebensraum" zur Verfügung, der vom Zustand der Wassersättigung bis zur Grenzplasmolyse reicht und innerhalb dessen die Zelle befähigt ist, ihre Funktion normal auszuüben, wobei die Zustände nahe der oberen Grenze wohl nur für kurze Zeit von der Pflanze ohne Schädigung vertragen werden. Der normale Zustand einer Zelle wird also irgendwo zwischen G und GP z. B. etwa bei N (siehe Abb. 1) sein.

Zurückkommend auf die eingangs durchgeführten Überlegungen über die als eine Ursache zum Zustandekommen des Schädigungsfaktors, im besonderen für N (Stickstoff) im Mitscherlichschen Ertragsgesetz, vermutete plasmolytische Schädigung der Wurzelzellen bei hohen Düngergaben ist festzustellen, daß zur genauen Durchleuchtung dieses Problems die Kenntnis des Grenzplasmolysewertes als Grenze des osmotischen Lebensbereiches der für die Nährstoffaufnahme in Frage kommenden Zellen notwendig ist. Die vorliegende Untersuchung erstreckt sich also auf die Epidermis des Wurzelteiles hinter den Meristemzellen, welcher, mit zahlreichen Wurzelhaaren versehen, wohl als die „aktive Zone“ (Philipp 1953) der Nährstoffaufnahme anzusehen ist. Dabei sollen die Verhältnisse während der Bestimmung dieser Größe möglichst „physiologisch“ sein, worauf im folgenden bei der Diskussion der Methodik und ihrer Fehlerquellen eingegangen wird.

Die Messung des Grenzplasmolysewertes (Ursprung 1939), also des osmotischen Wertes bei Grenzplasmolyse, geschieht, wie später noch genauer angeführt wird, durch Einbringen der zu untersuchenden Zellen in verschieden konzentrierte wäßrige Lösungen des Plasmolytikums. Nach einem bestimmten Zeitraum erfolgt die Beobachtung im Mikroskop, wobei als Grenzplasmolysewert jene Konzentration angesprochen wird, bei welcher 50% der Zellen des Gewebes beginnende Plasmolyse zeigen. Besonderes Augenmerk muß der Wahl des Plasmolytikums gewidmet werden. Die Anforderungen, die zu stellen sind, sind folgende: Gutes Permeiervermögen durch die Zellwand, Ungiftigkeit, chemische Passivität und Impermeabilität für das Plasma. Diese strengen Bedingungen sind praktisch wohl nur annähernd zu erreichen und am ehesten bei einem Nichtelektrolyten zu erfüllen. So ist eines der am häufigsten verwendeten Plasmolytika der Rohrzucker. Doch auch bei diesem sowie bei einigen anderen gebräuchlichen organischen Plasmolytika (Biebl 1948) ist eine ganz langsame Permeation in die Vakuole (Höfler 1926) möglich. Statt dem von den meisten Autoren bisher zu plasmolytischen Messungen herangezogenem Rohrzucker, wurde für die vorliegenden Versuche Mannit verwendet.

Ein weiterer Punkt ist die Plasmolysezeit. Es konnte gezeigt werden, daß dabei die Wasserpermeabilität eine wichtige Rolle spielt (Huber und Höfler 1950, Höfler 1950). Da jede über dem Grenzplasmolysewert liegende Konzentration eine langsam fortschreitende Plasmolyse hervorruft, muß man notwendigerweise den Gleichgewichtszustand abwarten, um den wahren Grenzplasmolysewert zu finden. Für Rohrzucker genügt im allgemeinen eine Zeit von 40 Minuten, und man darf wohl für Mannit dieselbe Zeit annehmen. Andererseits soll der Aufenthalt der Zellen im Plasmolytikum nicht zu lange währen, um Fehler durch Endo- oder Exosmose zu vermeiden.

Andere Ergebnisse sind bei Verwendung von Elektrolyten als Plasmolytika zu erwarten. Die Gefahr einer nennenswerten Permeation während der Versuchszeit ist hier (wesentlich) größer, was bei der Plasmolysezeit Berücksichtigung

finden muß; ebenso muß mit einer nicht unbedeutenden Beeinflussung des Plasmas gerechnet werden. Die Eigenschaften des Plasmas bei der Quellung (bei negativer Ladung) sind in den Quellungs- (lyotropen) Reihen dargestellt:

$\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$

für Kationen

$\text{SCN} > \text{J} > \text{NO}_3 > \text{Br} > \text{Cl} > \text{Acetat} > \text{SO}_4 > \text{Tartrat} > \text{Zitrat}$

für Anionen

Bei den zweiwertigen Ionen der Erdalkalimetalle, besonders bei Ca-Ionen, tritt die entquellende Wirkung mehr hervor als bei den Alkalimetallen. Man spricht hier von einem Ionenantagonismus zwischen K^+ und Ca^{++} . Von diesem Gesichtspunkt aus und im Hinblick auf die praktische Bedeutung dieser Ionen für die Düngung wurden im zweiten Teil dieser Arbeit KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ als Plasmolytika herangezogen, Plasmolytika, die früher vielfach Verwendung fanden, jedoch zur Bestimmung des wahren $G \cdot P$ -Wertes, wie oben ausgeführt, doch weniger geeignet als Rohrzucker bzw. Mannit erscheinen.

Während für die Nichtelektrolyte die Berechnung des osmotischen Druckes in Atmosphären einfach ist und außerdem für viele Verbindungen experimentelle Daten vorhanden sind, bestehen bei den Berechnungen für Elektrolyte Schwierigkeiten, weil hier der Dissoziation durch einen Faktor (osmotischer Koeffizient) Rechnung getragen werden muß. Besonders bei $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ liegen für Konzentrationen unter 0,1 Mol/Liter keine experimentellen Werte, weder für die osmotischen Drucke noch für osmotische Koeffizienten vor, und es ist daher eine mathematische Interpolation für diese Konzentrationen notwendig.

Weitere Fehlerquellen stecken in der Präparation des zur Messung verwendeten Pflanzenmaterials. Daß mechanische Beanspruchung der Zellen zu unrichtigen Ergebnissen führen kann, wurde besonders von Ursprung betont und ist wohl ohne weitere Begründung einzusehen. Bei der Herstellung von Gewebeschnitten ist dies aber nicht zu umgehen, außerdem sind Beeinflussungen von den aus den verletzten Zellen austretenden Zellinhaltsstoffen zu erwarten. Es kann zur Schein- bzw. Wundplasmolyse kommen, wie Höfler (1918) eine abnorm starke Plasmolyse in Zellen nahe des Wundrandes bezeichnet. Dies kann durch Infiltration des ganzen Organs mit dem Plasmolytikum vermieden werden (F. Weber 1929), oder es wird wie bei den vorliegenden Versuchen auf die Herstellung von Schnitten verzichtet und die Wurzeln unbeschädigt im Mikroskop beobachtet.

Nicht zuletzt ist den Licht- und Temperaturverhältnissen, welche möglichst für alle Versuche konstant gehalten werden sollen, Beachtung zu schenken, könnte sich doch der Eintritt des osmotischen Gleichgewichts in der Kälte verzögern, indem das Haftvermögen der Zelle zunimmt (Weber u. Hohenegger 1923 sowie Weber 1932). So wurden für die vorliegenden Versuche eine Temperatur von $23 \pm 2^\circ \text{C}$ eingehalten. Hier sei auch auf die mikroskopische Beobachtung der Grenzplasmolyse eingegangen. Die Beobachtung der Plasmolyse, im besonderen der Grenzplasmolyse von lebenden Zellen, welche keinen gefärbten Inhalt, sei es durch Chloro- oder Chromoplasten oder durch im Zellsaft gelöste Farbstoffe besitzen, bereitet gewisse Schwierigkeiten. Aus diesem Grunde wurden bisher von vielen Autoren Zellen mit gefärbtem Zellinhalt (Algen, *Rhodo*) zu grenzplasmolytischen Untersuchungen herangezogen. Eine Vitalfärbung kann

gute Dienste leisten, wird aber, da eine Beeinflussung des Plasmas nicht auszuschließen ist, für verschiedene Untersuchungen, wie in der vorliegenden Arbeit, wenn möglich zu vermeiden sein, wenn man statt der gewöhnlichen mikroskopischen Einrichtung ein Phasenkontrastmikroskop¹ benützt. Mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops ist es bei einiger Übung des Beobachters möglich, die Abhebung sonst kaum sichtbarer Plasmen von der Zellwand, also die Grenzplasmolyse, genau zu beobachten.

Vorversuche

Die Vorversuche sollten über die Details der beim Hauptversuch anzuwendenden Methode eine Klärung bringen und zur Gewöhnung der Augen des Beobachters an das auch im Phasenkontrastmikroskop nur schwer erkennbare Protoplasma der Wurzelepidermiszellen sowie seine Veränderung bei der Plasmolyse dienen. Es wurden im einzelnen folgende Versuche durchgeführt:

a) Wurzeln junger Tomatenpflanzen (aus Erde) wurden gewaschen, nach Anschneiden mit einer Rasierklinge wurde ein Gewebestück herausgerissen, welches in eine 0,5 mol. KNO_3 -Lösung eingebracht und ohne Färbung betrachtet wurde: Es war keine Plasmolyse eingetreten. Mit Neutralrot gefärbt (1 Tropfen Stammlösung + 3 Tropfen H_2O auf einem Objektträger mit dem Plasmolytikum vermischt): Plasmolyse gut zu beobachten.

b) Wurzeln von Haferkeimlingen (in Vinidurschalen gezogen) wurden mit einer Rasierklinge angeschnitten und von ihnen je ein 1 cm langes Gewebestück von der Wurzelspitze abgerissen. Nach Einbringung in mol. KNO_3 -Lösung konnte Plasmolyse in den Wurzelhaaren — nicht in den Epidermiszellen — im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden. Vorher mit Neutralrot 30 Minuten lang angefärbte Zellen lassen Plasmolyse deutlich erkennen.

c) Wurzelgewebestück von Haferkeimlingen, welches mit Neutralrot bzw. Methylenblau 1 Stunde lang gefärbt wurde, zeigte nach Verweilen von 15 Minuten in mol. KNO_3 -Lösung keine Plasmolyse, was möglicherweise auf Permeation beruhen könnte.

d) Wurzelgewebestück von Haferkeimlingen, gefärbt mit Neutralrot (1–2 Stunden), zeigte in molarer Lösung von Rohrzucker gute Plasmolyse, während die Bilder in KNO_3 -Lösung ungleichmäßiger waren. Die Plasmolyse war bereits 3 Minuten nach Einbringen in die Plasmolytika zu sehen. Überhaupt zeigte sich die Plasmolyse nur an Zellen von Gewebestücken deutlich, welche geschnitten wurden (nicht gerissen).

e) Wurzelgewebestück von Haferkeimlingen mit $\frac{m}{2}$ Mannit, $\frac{m}{2}$ KNO_3 und $\frac{m}{2}$ Rohrzucker als Plasmolytika.

Mannit zeigte auch ohne Färbung nach 5 Minuten Plasmolyse in den Epidermiszellen. Färbung mit Brillantkresylblau ergab eine bessere Sichtbarkeit der Plasmolyse, doch trat eine sichtbare Schädigung des Plasmas (Granulation) der gefärbten Zellen ein.

f) Wurzelgewebestück von Haferkeimlingen in Mannit:

¹ Für die vorliegende Arbeit haben sich die Instrumente, bestehend aus: Binokulares Mikroskop „CSM“ mit viereckigem Kreuztisch Nr. 22, Phasenkontrasteinrichtung (Phasenkontrast-Trocken-Achromat-Objektiv Ph 45:1, $A = 0,65$ Phasenkontrast-Kondensor), Mikroskopier-Niedervoltlampe „Lux FNI“, Huygens Okular $10\times$ der Optischen Werke C. Reichert AG., Wien, bestens bewährt.

Je 3 bis 4 Gewebeschnitte (Rasierklänge) von 3 bis 4 cm langen Wurzeln wurden in 10 cm³ Mannitlösung steigender Konzentration gebracht. Die Schnitte stammten aus der Mitte der Wurzeln (1,5–2 cm von der Spitze), welche 4 Tage alten Haferkeimlingen entnommen waren (in Vinidurschalen gezogen). Nach 2–5 Stunden wurde im Phasenkontrast beobachtet:

- 0,02 m: keine Plasmolyse,
- 0,03 m: keine Plasmolyse,
- 0,04 m: keine Plasmolyse,
- 0,05 m: keine Plasmolyse,
- 0,06 m: keine Plasmolyse,
- 0,07 m: keine Plasmolyse (Kalyptra),
- 0,08 m: keine Plasmolyse,
- 0,09 m: 50% der Epidermiszellen plasmolysiert,
- 0,1 m: Zellen unterhalb der Wurzelspitze zeigen Plasmolyse, auch andere Zellen zu etwa 60% plasmolysiert. Deplasmolyse normal.

Wurzelhaare überall durch Bakterien beschädigt, Beobachtung war dadurch sehr erschwert.

Wiederholung von obigem Versuch zeigte:

- 0,08 m: 10–20% plasmolysiert,
- 0,085 m: 50% plasmolysiert, Deplasmolyse normal,
- 0,09 m: 70% plasmolysiert,
- 0,095 m: 80–90% plasmolysiert,
- 0,1 m: 100% plasmolysiert,

H₂O: etwa 5% der Zellen zeigen plasmolyseähnliche Bilder (Vakuolenkontraktion? ähnliche Beobachtungen wurden schon von mehreren Autoren [vgl. Ursprung 1939] beschrieben).

g) Wurzelgewebestück von Haferkeimlingen in Rohrzucker:

Hafer wurde 8 Tage in dest. Wasser angekeimt. 4 Gewebestücke wurden in etwa 10 cm³ Lösung gebracht. Nach 4 Stunden Beobachtung im Mikroskop.

- 0,05 m: 1% der Zellen plasmolysiert,
- 0,06 m: nur mechanisch geschädigte Zellen zeigen Plasmolyse,
- 0,07 m: nur mechanisch geschädigte Zellen zeigen Plasmolyse,
- 0,08 m: einige Zellen plasmolysiert,
- 0,085 m: etwa 50% der Zellen plasmolysiert,
- 0,09 m: 60–70% der Zellen plasmolysiert,
- 0,1 m: 90% der Zellen plasmolysiert.

h) Wurzelgewebestück von Haferkeimlingen in Mannit (Färbung mit Brillantkresylblau): Gewebestücke 14 Tage alter Haferkeimlingswurzeln wurden 1 Stunde lang in schwach gefärbte, wäßrige Brillantkresylblau-Lösung eingebracht, dann in Mannitlösung gegeben und nach 1–2 Stunden beobachtet.

- 0,1 m: 80–100% der Epidermiszellen plasmolysiert, innenliegende Zellen nicht plasmolysiert, jedoch keine Plasmaströmung sichtbar. Kalyptra 95% plasmolysiert,
- 0,08 m: 80% der Zellen plasmolysiert, Kalyptra zu 95% plasmolysiert,
- 0,05 m: nur beschädigte Zellen zeigen Plasmolyse,
- 0: keine Plasmolyse zu beobachten.

Versuchsbedingungen wie oben, jedoch ohne Vitalfärbung:

- 0,1 m: 80–90% der Zellen plasmolysiert,
- 0,08 m: 50–70% der Zellen plasmolysiert, Deplasmolyse normal,
- 0,05 m: 50% der Zellen plasmolysiert, Bakterien an und in Wurzelhaaren.

Versuchsbedingungen wie oben, Verwendung von Brillantkresylblau: Keine Plasmolyse, viele Protozoen und Bakterien im Gewebe, leichte Beobachtung.

Dieser Versuch wurde noch dreimal mit 7, 8 und 10 Tage alten Haferkeimlingswurzeln mit demselben Ergebnis wiederholt.

i) Haferkeimlingswurzeln in Mannit:

12 Tage alte Haferkeimlinge, deren Blätter 1 cm oberhalb des Samenkornes abgeschnitten wurden. Die Wurzeln wurden drei Stunden lang im Plasmolytikum belassen und anschließend Schnitte davon beobachtet.

0,3 m: 60—90% lassen Plasmolyse erkennen,

0,1 m: 70—80% lassen Plasmolyse erkennen,

0,08 m: keine Plasmolyse bzw. nur beschädigte Zellen plasmolysiert,

0,05 m: keine Plasmolyse bzw. nur beschädigte Zellen plasmolysiert,

0: nur beschädigte Zellen scheinen plasmolysiert (Vakuolenkontraktion).

Die Wiederholung zeigte dasselbe Ergebnis.

j) Haferkeimlingswurzeln in Mannit:

8 Tage alte Haferkeimlinge wurden mit den Wurzeln vier Stunden lang in Mannitlösung getaucht und dann Gewebestücke mittels Rasierklinge abgeschnitten bzw. abgerissen.

0,5 m: 90—100% plasmolysiert,

0,25 m: 90—100% plasmolysiert,

0,1 m: 90—100% plasmolysiert, Deplasmolyse normal,

0,5 m: 40% plasmolysiert, Deplasmolyse normal.

Wiederholung des Versuches mit unbeschädigten Wurzeln zeigte das gleiche Ergebnis.

Dazu ist zu bemerken:

Die Heranzucht der Haferkeimlinge erfolgte in mit feuchtem Filtrierpapier ausgelegten emaillierten Blechwannen, in welche das mit Ceresan gebeizte Saatgut (Flämings Treue 1950) ausgestreut wurde. Die Keimung erfolgte zwei Tage lang unter dem Fluoreszenzlicht einer „Philipsleuchte“ und anschließend im Tageslicht. Zu den Versuchen wurden jeweils die am besten entwickelten Pflanzen herangezogen. Die Beobachtung der Schnitte bzw. Wurzeln erfolgte mit dem Phasenkontrastmikroskop (C. Reichert, Wien) bei einer Vergrößerung 100:1 und 450:1. Die Versuche mit Vitalfärbung wurden durchgeführt, um die Sichtbarkeit des Plasmas zu verbessern. Wie sich aus den Vorversuchen ergab, haben jedoch die Vitalfarbstoffe einen ungünstigen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, was für eine Beeinflussung des Plasmas durch Farbstoffe spricht. (Geprüft wurden Methylenblau, Neutralrot, Brillantkresylblau.) Dies konnte nach Angaben in der Literatur (Bogen 1951) erwartet werden. Im Laufe der Zeit konnte durch Übung auf eine Färbung verzichtet werden.

Bei der Wahl des Plasmolytikums wurde zuerst an ein anorganisches Salz gedacht, jedoch wegen des besseren Überblickes über die Vorgänge bei der Plasmolyse — wie bereits in der Einleitung ausgeführt — Rohrzucker bzw. später Mannit für die Versuche verwendet.

Mannit zeigte nach Höber (1947) bei *Chara*-Zellen eine Halbsättigungszeit von 42.000 Minuten und eine Reaktion innerhalb der Zelle, welche zu einer Änderung der Membraneigenschaften des Plasmas führen könnte, ist daher wohl ausgeschlossen. Außerdem wurde von der ursprünglichen Me-

thode abgegangen, indem statt Gewebeschnitten intakte Wurzeln beobachtet wurden. Es lassen sich so Fehler durch Verletzung von Zellen sowie Beobachtungsfehler durch nicht genaues Erkennen der Epidermiszellen vermeiden, außerdem sind die Permeationsbedingungen übersichtlicher. Es zeigte sich auch, daß eine besondere Schwierigkeit darin besteht, Wurzeln von nicht in Wasserkultur, sondern in Erde gezogenen Pflanzen zu schneiden; aber die Beobachtung kleiner Seitenwurzeln von Pflanzen, die in Erde gezogen waren, verursacht dagegen keine großen Schwierigkeiten. Zusammenfassend ergab sich also aus den Vorversuchen

erstens, daß eine Beobachtung des ungefärbten Protoplasmas von Epidermiszellen der Wurzeln der Hauptgetreidearten im Phasenkontrastmikroskop möglich ist;

zweitens, daß als Plasmolytikum Mannit am geeignetsten ist;

drittens, daß am besten unbeschädigte Wurzeln statt Gewebeschnitten zur Plasmolyse und zur Beobachtung kommen und

viertens, daß der Grenzplasmolysewert der Epidermiszellen der untersuchten Pflanzen ungefähr 0,1 Mol/Liter beträgt. Diese Ergebnisse wurden bei der Anlage der Hauptversuche berücksichtigt.

Hauptversuch mit Mannit als Plasmolytikum

Zum Hauptversuch wurden Hafer, Sommergerste, Sommerweizen und Sommerroggen in Mitscherlichgefäßen gezogen.

Kulturangaben:

Grunddüngung: 3,6 g 40er Kali + 3,66 g Nitramoncal pro Gefäß

Gefäß Nr.	Kultur
-----------	--------

316—319	Hafer (Endress Weiss)
320—323	Sommergerste (Ackermanns Isaria)
324—327	Sommerweizen (Hohenstauffen)
328—331	Sommerroggen (Berna)

Leondinger Versuchsboden: pH = 7,3, H₂O = 16,4%
CaCO₃ (nach Scheibler) = 3,8%
P₂O₅ 25,0 mg/100 g Boden
K₂O 7,5 mg/100 g Boden

Durchführung:

5. 5. 1952: Füllung der Gefäße.

7. 5. 1952: Anbau (38 Körner pro Gefäß).

10. 5. 1952: Auflaufen der Saat.

Die Bewässerung wurde in der bei Mitscherlichversuchen üblichen Art durchgeführt (Einstellen bis zu 70% der Wasserkapazität des Bodens). Zur Untersuchung wurden bei jeder Probenahme aus den Mitscherlichgefäßen jedes Ansatzes je zwei Pflanzen ausgegraben, unter der Wasserleitung von Erde gereinigt, mit dest. Wasser gespült und etwa 15 Minuten eingewässert. Anschließend wurden je 2—3 Wurzeln (mit Seitenwurzeln) in die Mannitlösung, welche eine Temperatur von $23 \pm 2^\circ \text{C}$ hatte, ein-

gebracht und in einem Zeitraum von 1 bis 5 Stunden nach Einbringung beobachtet. Dazu wurden etwa 3—5 mm lange Wurzelstücke (möglichst Seitenwurzeln, weil deren Epidermis am besten erhalten war) auf den Objektträger gebracht und mit der Mannitlösung entsprechender Konzentration betropft, mit Deckglas bedeckt und beobachtet. Die Herstellung der einzelnen Mannitlösungen verschiedener Konzentration geschah durch Verdünnen mit dest. Wasser aus einer 0,5 mol. Mannit-Stammlösung, welche jeweils kurz vor dem Versuch angesetzt wurde. Der Mannit stammte von der Fa. Mallinckrodt, USA, und war als chemisch rein bezeichnet. Es wurde die entsprechende Menge eingewogen, in möglichst wenig warmem dest. Wasser gelöst, durch eine Glasfritte (Jena G 4) filtriert und im Meßkolben aufgefüllt. Die Haltbarkeit der Lösung beschränkte sich auf etwa einen Tag, nach dieser Zeit konnten bereits Bakterienkolonien nachgewiesen werden. Zur Bestimmung des Grenzplasmolysewertes wurden um 0,05 M abgestufte Mannitlösungen verwendet und nach Ursprung verfahren, indem die jeweils plasmolyisierte Anzahl von Zellen im Gesichtsfeld prozentuell zu der gesamten Zellenzahl (meist 5 bis 20 und mehr) bestimmt wurde. Je Ansatz wurden mindestens drei Wurzeln, meist jedoch wesentlich mehr (bis zu zwölf) beobachtet. Grenzplasmolyse wurde nach Ursprung angenommen, wenn 50% der Zellen plasmolysiert waren. Die Untersuchung erfolgte in Abständen von 6 bis 10 Tagen.

Hier sei noch kurz auf einen bisher noch nicht erwähnten Punkt eingegangen: auf die Plasmolyseform. In den meisten Fällen wurde Eckenplasmolyse beobachtet sowie verschiedene Konvexplasmolyseformen. Nur in einigen wenigen Fällen wurde auch eine schlechte Ablösbarkeit des Plasmas von der Zellwand, also konkave bzw. Krampfplasmolyse beobachtet. Um sich von der Realität der Plasmolyse und der Unterscheidung von postmortalen oder anderen Kontraktionen des Plasmas zu überzeugen, wurde von Fall zu Fall durch Verdünnen der Außenlösung am Objekt-

Tab. 1. Mannit.

<i>C</i>	π
0,2	4,82
0,18	4,37
0,15	3,65
0,1	2,45
0,08	1,94

träger unter dem Mikroskop deplasmolysiert. Sehr wenige Versuche, welche keine normale Deplasmolyse zeigten, wurden ausgeschieden.

Die Umrechnung des Grenzplasmolysewertes in Atmosphären erfolgte nach der bekannten Gleichung für den osmotischen Druck (Eggert)

$$\pi = C \cdot R \cdot T \quad (5)$$

π ... osmotischer Druck in Atmosphären,

C ... Mol/Liter,

R ... Gaskonstante,

T ... absolute Temperatur.

Den Grenzplasmolysewert in Atmosphären auszudrücken ist notwendig, um den Vergleich zwischen den mit verschiedenen Plasmolytika durchgeführten Versuchen, besonders zwischen Nichtelektrolyten und Elektrolyten, ziehen zu können, wie es im Verlaufe der vorliegenden Arbeit geschieht.

Hauptversuch mit KNO_3 als Plasmolytikum

Zu diesem Versuch wurden Hafer, Sommergerste, Sommerroggen und Sommerweizen derselben Sorte wie beim Mannitversuch in Mitscherlichgefäßen gezogen.

Kulturangaben:

Grunddüngung: 3,6 g 40er Kali + 3,66 g Nitramoncal pro Gefäß

Leondinger Versuchsboden: pH = 6,5, $\text{H}_2\text{O} = 15,7\%$

CaCO_3 (nach Scheibler) = 3,8%

P_2O_5 25 mg/100 g Boden

K_2O 7,5 mg/100 g Boden

Krümelbestand 4

Humus 2,3%

Durchführung:

5.5.1953: Anbau der Gefäße.

7.5.1953: Auflaufen der Saat.

Bewässerung: normal nach Bedarf.

Die Probenahme, Präparation zur Beobachtung erfolgte analog dem Mannitversuch und wurde dort bereits genau beschrieben. Die anderen Eigenschaften von KNO_3 wurden insofern berücksichtigt, als der Zeitraum zwischen Einbringen der Wurzel in das Plasmolytikum und Beobachtung nur 5–10 Minuten betrug. Eine Permeation konnte so weitgehend vermieden werden, da sich bei Ausdehnung der Plasmolysezeit auf das Doppelte keine wesentliche Änderung des Grenzplasmolysewertes zeigte. Das verwendete KNO_3 p. A. stammte von der Fa. Merck. Die Herstellung der Plasmolyselösungen erfolgte durch Verdünnen einer 0,1 mol. Stammlösung. Die Abstufungen betrugen 0,02–0,05 M. Die erhaltenen Grenzplasmolysewerte wurden nach der bekannten Formel für den osmotischen Druck (Eggert) berechnet

$$\pi = i \cdot C \cdot R \cdot T, \quad (4)$$

worin π den osmotischen Druck in Atmosphären,

$i = n \cdot f_0$ den van 't Hoff'schen Koeffizienten (n = Zahl der Ionen, in die das Molekül dissoziiert, f_0 = osmotischer Koeffizient),

C = die Konzentration in Mol/Liter,

R = die Gaskonstante,

T = absolute Temperatur

bedeutet

Die osmotischen Koeffizienten f_0 wurden physikalisch-chemischen Tabellen entnommen und haben folgende Werte:

C	f_0
0,1	0,906
0,2	0,873
0,3	0,851

Diese experimentellen Werte sowie die Werte der experimentellen osmotischen Koeffizienten für $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ verdanke ich einer persönlichen Mitteilung von Herrn Prof. Dr. L. Ebert, Vorstand des I. Chem. Instituts der Universität Wien. Die Werte für Konzentrationen unter 0,1 Mol/Liter wurden aus der nach der Debye-Hückelschen Grenzformel (Eucken)

$$1 - f_0 = \frac{0,9906 \cdot 10^6}{(\epsilon \cdot T)^{\frac{3}{2}}} \cdot \left(\frac{\sum \nu_i Z_i^2}{\nu} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \sqrt{\nu \cdot C} \quad (5)$$

hierin bedeutet: ϵ ... Dielektrizitätskonstante,

T ... Kelvintemperatur,

ν ... Zahl der Ionen je Molekül,

C ... Mole je Liter,

ν_i ... Zahl der Ionen der Sorte i im Molekül,

Z_i ... Ladung der Ionen der Sorte i

erhaltenen Kurve (Schmidt) — siehe Abb. 2 und Tab. 2 — und der experimentellen Werte für 0,1, 0,2, 0,3 Mol/Liter graphisch interpoliert. KNO_3 gehört zu denjenigen Salzen, deren experimentelle Werte ($1 - f_0$) nur geringe Abweichungen von den theoretischen Werten haben.

Tab. 2. KNO_3 .

C	f_0	π
0,1	0,906	4,40
0,08	0,910	3,54
0,05	0,926	2,25
0,04	0,935	1,81
0,03	0,941	1,37

Hauptversuch mit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ als Plasmolytikum

Das Pflanzenmaterial für diesen Versuch stammte aus denselben Mitscherlichgefäßen wie für den Versuch mit KNO_3 . Auch die Probenahme, Präparation und Beobachtung erfolgte wie in diesem Versuch. Die Plasmolyselösungen wurden durch Verdünnen einer 0,1 bzw. 0,15 molaren Stammlösung hergestellt. Es gelangte $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p. A. der Fa. Merck zur Verwendung. Die erhaltenen Grenzplasmolysewerte wurden wieder nach Gleichung (4) in Atmosphären umgerechnet. Die osmotischen Koeffizienten wurden wieder physikalisch-chemischen Tabellen entnommen und haben die Werte

C	f_0
0,1	0,827
0,2	0,819
0,3	0,818

Zuverlässige Meßwerte unter $0,1\text{ m}$ konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Der Vergleich zwischen den osmotischen Koeffizienten bzw. der Differenz $1 - f_0$, wie sie nach der Debye-Hückelschen Gleichung zu erwarten war und den experimentellen Werten ergab größere negative Abweichungen von der Grenzgeraden. Eine graphische Bestimmung der osmotischen Koeffizienten unter $0,1\text{ m}$ wie bei KNO_3 hätte daher zu große Fehler ergeben, und so wurde eine mathematische Näherungslösung des Problems, das aufs engste mit der elektrolytischen Dissoziation der Salze zusammenhängt, versucht und wie folgt durchgeführt:

Wie eine Betrachtung der osmotischen Koeffizienten bzw. der Differenz $(1 - f_0)$ zeigt (u. a. auch bei Schmidt), entspringen die Kurven für $(1 - f_0)$ gegen m (nach der Debye-Hückelschen Gleichung), aufgetragen im O-Punkt [für $m = 0$ ist auch $(1 - f_0) = 0$], und streben mit steigendem m einem Höchstwert („Sättigungswert“) asymptotisch zu. Kurven dieser Art lassen sich mathematisch durch die Gleichung

$$y = A \cdot (1 - e^{-kx}) \quad (6)$$

allgemein beschreiben.

Es bedeutet:

$y, x \dots$ Variable,

$A \dots$ Sättigungswert, dem sich die Kurve asymptotisch nähert,

$k \dots$ Konstante.

Für das speziell vorliegende Problem lautet die Gleichung:

$$(1 - f_0) = A_0 \cdot (1 - e^{-k\sqrt{m}}). \quad (7)$$

Wenn man nun annimmt, daß näherungsweise $A_0 = (1 - f_0)_{0,3\text{ m}}$, so kann man aus den experimentellen Daten durch Einsetzen in die Gleichung (7) k bestimmen; in unserem Falle ergibt sich für k ein Mittelwert von $k = 10,571 \pm 1,068$. Mit Hilfe dieser Konstante lassen sich aus Gleichung (7) die osmotischen Drucke für beliebige Molaritäten mit für uns ausreichender Genauigkeit unter $0,1\text{ m}$ berechnen (siehe Tab. 3). Die graphische Darstellung (Abb. 2) zeigt, wie

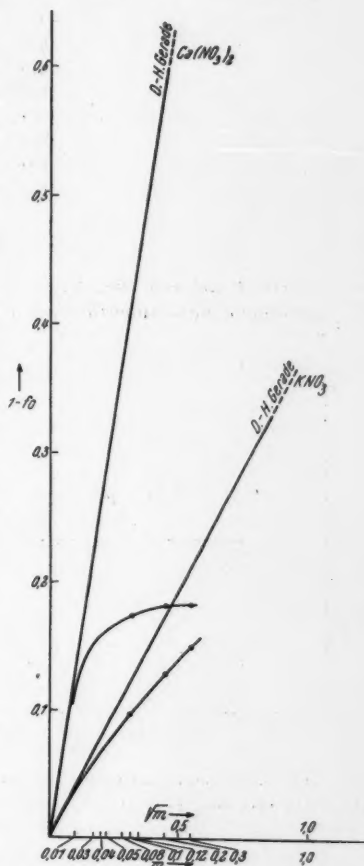


Abb. 2. Zusammenhang zwischen $1 - f_0$ und Molarität (bzw. \sqrt{m}) für Lösungen von KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Theoretische Werte (Debye-Hückel-Gerade); experimentelle Punkte durch interpolierte Kurve verbunden.

sich die berechneten Werte harmonisch zu den experimentellen hinzufügen lassen.

Tab. 3. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

C	f_0	π
0,12	0,823	7,20
0,10	0,827	6,03
0,08	0,828	4,83
0,05	0,836	3,05
0,04	0,840	2,45
0,03	0,847	1,85
0,01	0,882	0,645

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuche sind in den folgenden Tabellen und Diagrammen zusammenfassend dargestellt. Die Tabellen 4–6 zeigen die

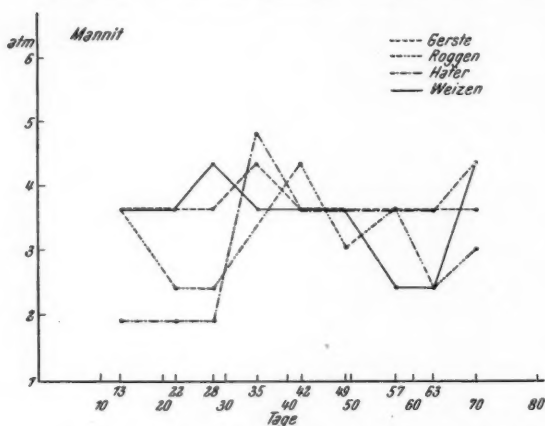


Abb. 3. Grenzplasmolysewerte (atm) der Getreidearten im Laufe der Vegetationsperiode (Mannit als Plasmolytikum).

werte in Abhängigkeit von der Vegetationsdauer für die verschiedenen Getreidearten für je ein Plasmolytikum zusammen. In den folgenden Abbildungen (Nr. 6–9) sind die Grenzplasmolysewerte in Abhängigkeit von der Vegetationsdauer für die verschiedenen Plasmolytika für je eine Getreideart dargestellt. Diese Darstellungsweisen erscheinen zur Beantwortung der gestellten Fragen am besten geeignet.

Diskussion der Ergebnisse

Die Untersuchung erstreckte sich etwa von der Bestockung des Getreides, also von dem Zeitpunkt, bei dem die Keimwurzeln bzw. Primär-

mit den verschiedenen Plasmolytika zu verschiedenen Zeiten erhaltenen Grenzplasmolysewerte, ausgedrückt in Mol/Liter, wie sie bei den Versuchen erhalten wurden, sowie die daraus errechneten Werte in Atmosphären (osmotischer Druck) und die prozentuellen Salzkonzentrationen.

In den Diagrammen wurden die Ergebnisse auf zweierlei Art dargestellt: Die Abb. Nr. 3–5 stellen die Grenzplasmolyse-

wurzeln durch die aus dem unteren Teil des Sprosses adventiv gebildeten Kronenwurzeln ersetzt werden und es zur Entwicklung von Seitensprossen kommt, über das Schossen und Ährenschieben bis zur Reife bzw. dem Absterben der Wurzeln.

Wie zu erwarten war, wurden mit den verschiedenen Plasmolytika bei den einzelnen Getreidearten verschiedene Grenzplasmolysewerte erhalten. Betrachten wir zuerst die Werte, welche Mannit als Plasmolytikum lieferte (siehe Tab. 4 und Abb. 3). Zu Beginn der Untersuchung, zur Zeit der Bestockung, lagen die GPW (Grenzplasmolysewerte) für Weizen und Gerste sowie anfangs auch für Roggen bei 3,65 at und für Hafer bei 1,94 at. Der Zwischenraum zwischen Bestockung und Schossen zeichnete sich durch ein Konstantbleiben des GPW aus, wenn man von der Erniedrigung des GPW des auch im weiteren Verlauf der Untersuchungen sehr schwankende Werte zeigten den Roggens absieht. Während der Zeit des Schossens, also des maximalen vegetativen Wachstums der Getreidepflanzen, erreichten die GPW ein Maximum, welches vom Weizen nach etwa 28 Tagen Vegetationsdauer, von Hafer nach 35 Tagen und von Roggen nach 42 Tagen erreicht wird. Während des Ährenschiebens (46.—56. Tag) ist ein Absinken der GPW zu beobachten,

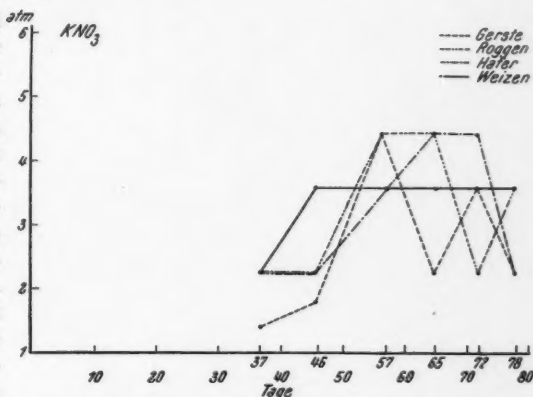


Abb. 4. Grenzplasmolysewerte (atm) der Getreidearten im Laufe der Vegetationsperiode (KNO_3 als Plasmolytikum).

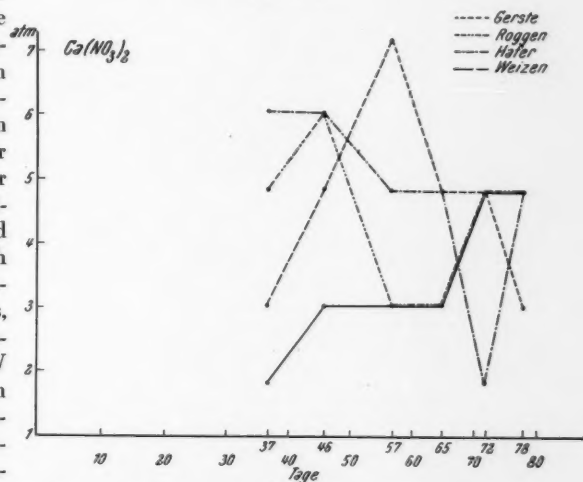


Abb. 5. Grenzplasmolysewerte (atm) der Getreidearten im Laufe der Vegetationsperiode ($Ca(NO_3)_2$ als Plasmolytikum).

Während des Schossens, also des maximalen vegetativen Wachstums der Getreidepflanzen, erreichten die GPW ein Maximum, welches vom Weizen nach etwa 28 Tagen Vegetationsdauer, von Hafer nach 35 Tagen und von Roggen nach 42 Tagen erreicht wird. Während des Ährenschiebens (46.—56. Tag) ist ein Absinken der GPW zu beobachten,

dem ein Konstantbleiben zur Zeit der Ausbildung der Samen und ein Ansteigen mit Beginn der Reife folgt. Der Verlauf der GPW-Kurven im Laufe

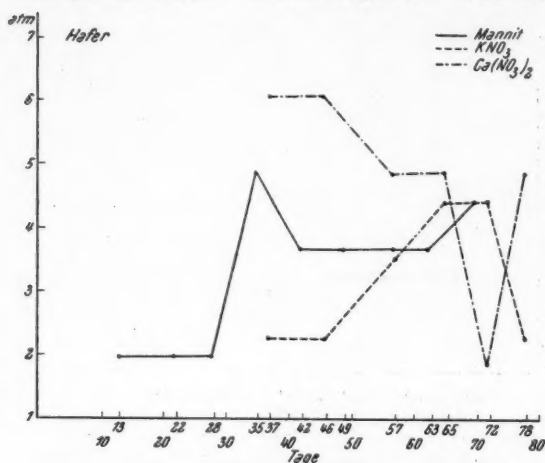


Abb. 6. Grenzplasmolysewerte (atm) von Hafer im Laufe der Vegetationsperiode für verschiedene Plasmolytika (Mannit, KNO₃, Ca(NO₃)₂).

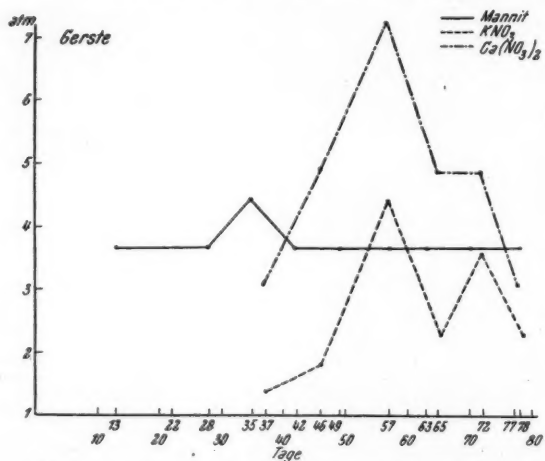


Abb. 7. Grenzplasmolysewerte (atm) von Gerste im Laufe der Vegetationsperiode für verschiedene Plasmolytika (Mannit, KNO₃, Ca(NO₃)₂).

den Reife. Es zeigte sich, daß die GPW für die einzelnen Geteidearten zur Zeit des Schossens ziemlich tief (zwischen 1,37—2,25 at) liegen, was im Vergleich zu den mit Mannit erhaltenen Werten auf eine gewisse Empfindlich-

keit der Vegetationsperiode ist also, von kleinen Schwankungen abgesehen, bei allen vier untersuchten Getreidearten gleich und ein Vergleich mit der Vitalitätskurve läßt eine gewisse Korrelation erkennen. Aus dem gleichartigen Verlauf und der angeführten Parallelität der GPW kann man ferner schließen, daß irgendeine weitergehende Beeinflussung der untersuchten Zellen, sei es durch Permeation des Plasmolytikums oder durch Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Zellwände, wohl ausgeschlossen werden kann. Es wird im weiteren gezeigt werden, daß dies bei der Verwendung von Elektrolyten als Plasmolytika nicht gesagt werden kann. Betrachtet man die Versuche mit KNO₃ (siehe Tab. 5 und Abb. 4), so tritt der Unterschied in den GPW bereits deutlich zutage. Hier erstreckten sich die Untersuchungen über den Zeitraum des Schossens, Ährenschiebens bis zur beginnenden

keit der Zellen bzw. des Plasmas gegenüber dem Plasmolytikum KNO_3 bzw. dessen Ionen während dieses Zeitraumes schließen läßt. Mit fortschreitender Vegetationsperiode ist allen Getreidearten ein Ansteigen der GPW gemeinsam, abgesehen von zeitlichen und größenmäßigen Unterschieden, die aber doch den „Trend“ deutlich erkennen lassen. Gegen Ende der Vegetationsperiode nach dem Ährenschieben tritt mit Ausnahme von Weizen wieder ein Absinken der GPW, also eine Zunahme der Empfindlichkeit ein. Größere Unterschiede zwischen den GPW der Getreidearten sind bei den mit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (siehe Tab. 6 und Abb. 5) als Plasmolytikum erhaltenen Werten zu sehen. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über denselben Abschnitt der Vegetationsperiode wie beim vorher beschriebenen Versuch mit KNO_3 . Während Hafer und Roggen zur Zeit des Schossens relativ hohe GPW (6,03 bzw. 4,03 at) hatten bzw. innerhalb dieses Zeitraumes erreichten, zeigten Gerste und Weizen zu diesem Zeitpunkt einen relativ niedrigen GPW, welcher erst beim Ährenschieben ein Maximum erreichte, zu einem Zeitpunkt, bei dem die GPW von Roggen und Hafer bereits eine fallende Tendenz zeigten. Mit Ausnahme von Roggen steigen die GPW gegen Ende der Vegetationsperiode wieder etwas an. Bei diesen Versuchen ist also eine gewisse Ähnlichkeit der Eigenschaften bei

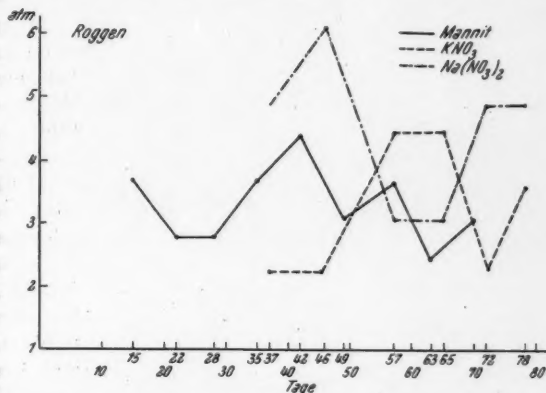


Abb. 8. Grenzplasmolysewerte (atm) von Roggen im Laufe der Vegetationsperiode für verschiedene Plasmolytika (Mannit, KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

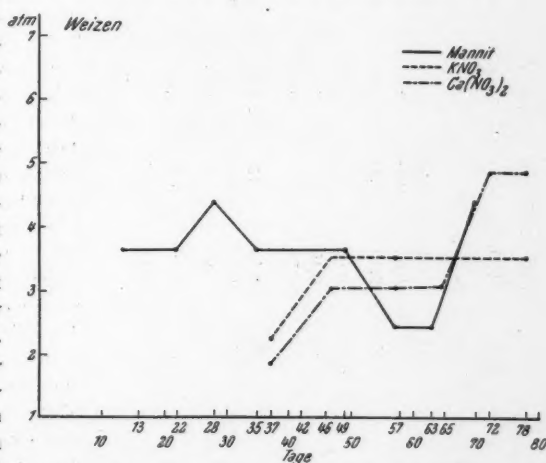


Abb. 9. Grenzplasmolysewerte (atm) von Weizen im Laufe der Vegetationsperiode für verschiedene Plasmolytika (Mannit, KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

Tab. 4. Mannit, Anbau des Saatgutes am 7. 5. 1952.

Datum	20. 5.	29. 5.	4. 6.	11. 6.	18. 6.	25. 6.	3. 7.	9. 7.	16. 7.	23. 7.
Tag nach dem Anbau	13. Tag	22. Tag	28. Tag	35. Tag	42. Tag	49. Tag	57. Tag	63. Tag	70. Tag	77. Tag
Hafer	1,94	1,94	1,94	4,82	3,65	3,65	3,65	3,65	4,37	Plasma
	0,08	0,08	0,08	0,2	0,15	0,15	0,15	0,15	0,18	koagul.
	1,45	1,45	1,45	3,64	2,73	2,73	2,73	2,73	3,28	at
Gerste	3,65	3,65	3,65	4,37	3,65	3,65	3,65	3,65	3,65	3,65
	0,15	0,15	0,15	0,18	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
	2,73	2,73	2,73	3,28	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73
Roggen	3,65	2,43	2,43	3,65	4,37	3,04	3,65	2,43	3,04	Plasma
	0,15	0,1	0,1	0,15	0,18	0,12	0,15	0,1	0,12	koagul.
	2,73	1,82	1,82	2,73	3,28	2,19	2,73	1,82	2,19	at
Weizen	3,65	3,65	4,37	3,65	3,65	3,65	2,43	2,43	4,37	Plasma
	0,15	0,15	0,18	0,15	0,15	0,15	0,1	0,1	0,18	koagul.
	2,73	2,73	3,28	2,73	2,73	2,73	1,82	1,82	3,28	at

der Plasmolyse der Wurzel-epidermiszellen mit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ als Plasmolytikum bei Hafer und Roggen festzustellen.

Wenden wir uns nun der zweiten Darstellungsweise der Ergebnisse (Abb. 6—9) zu. Für Hafer ergibt sich folgendes Bild: Die GPW-Kurve für Mannit als Plasmolytikum steigt nach einer Latenzzeit zu einem Maximum während des Schossens an, klingt dann wieder ab, um gegen Ende der Vegetationsperiode wieder etwas anzusteigen. Diese Kurve wird nun von denen für KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ eingeschlossen. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ liefert meistens höhere Werte als Mannit, eine Beobachtung, welche in Analogie zu der von Knudsen und Ginsburg (1921) mit CaCl_2 gemachten steht, während mit KNO_3 tiefere Werte erhalten wurden. Die Tendenz der mit den Elektrolyten erhaltenen Kurven ist ausgesprochen gegenläufig. Diese Gegenläufigkeit kann mit einer Wirkung der verschiedenen Kationen (Anionen sind jeweils gleich) auf die Zellwand oder, was wahrscheinlicher ist, auf das Plasma seine Erklärung finden. Zieht man außer einer anderen nur die quellende bzw. entquellende Wirkung in Betracht, so ergibt sich gemäß der lyotropen Reihe für K^+ eine Quellung und für Ca^{++} eine Entquellung (Frey-Wyssling) der Eiweißstoffe. Damit treten wahrscheinlich aber auch Änderungen der Permeabilitätseigenschaften des Plasmas auf, ganz abgesehen

davon, daß eine chemische Bindung dieser Ionen an die Eiweißstoffe des Plasmas weitergehende Veränderungen desselben hervorrufen kann. Die tatsächlichen osmotischen Verhältnisse in der unbeeinflussten Zelle werden daher am besten durch Plasmolyse mit einem Nichtelektrolyten, wie in

Tab. 5. KNO_3 . Anbau des Saatgutes am 5. 5. 1953.

Datum	10. 6.	19. 6.	30. 6.	8. 7.	15. 7.	21. 7.	
Tag nach dem Anbau	37. Tag	46. Tag	57. Tag	65. Tag	72. Tag	78. Tag	
Hafer	2,25	2,25	3,54	4,40	4,40	2,25	at
	0,05	0,05	0,08	0,1	0,1	0,05	mol
	0,5	0,5	0,8	1,0	1,0	0,5	%
Gerste	1,37	1,81	4,40	2,25	3,54	2,25	at
	0,03	0,04	0,1	0,05	0,08	0,05	mol
	0,3	0,4	1,0	0,5	0,8	0,5	%
Roggen	2,25	2,25	4,40	4,40	2,25	3,54	at
	0,05	0,05	0,1	0,1	0,05	0,08	mol
	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,8	%
Weizen	2,25	3,54	3,54	3,54	3,54	3,54	at
	0,05	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	mol
	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	%

Tab. 6. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Anbau des Saatgutes am 5. 5. 1953.

Datum	10. 6.	19. 6.	30. 6.	8. 7.	15. 7.	21. 7.	
Tag nach dem Anbau	37. Tag	46. Tag	57. Tag	65. Tag	72. Tag	78. Tag	
Hafer	6,03	6,03	4,83	4,83	1,85	4,83	at
	0,1	0,1	0,08	0,08	0,03	0,08	mol
	1,64	1,64	1,31	1,31	0,49	1,31	%
Gerste	3,05	4,83	7,20	4,83	4,83	3,05	at
	0,05	0,08	0,12	0,08	0,08	0,05	mol
	0,82	1,31	1,97	1,31	1,31	0,82	%
Roggen	4,83	6,03	3,05	3,05	4,83	4,83	at
	0,08	0,1	0,05	0,05	0,08	0,08	mol
	1,31	1,64	0,82	0,82	1,31	1,31	%
Weizen	1,85	3,05	3,05	3,05	4,83	4,83	at
	0,03	0,05	0,05	0,05	0,03	0,08	mol
	0,49	0,82	0,82	0,82	1,31	1,31	%

unserem Falle mit Mannit, einer Aufklärung zugeführt. Für die praktische Düngeranwendung, dem Ausgangspunkt unserer Untersuchungen, ergibt sich für Hafer also eine Empfindlichkeit gegen K-Ionen zur Zeit des größten Wachstums (Schossens) und eine relative Unempfindlichkeit gegen Ca-Ionen zu dieser Zeit — alles vom Standpunkt des osmotischen Zustandes der Wurzelzellen, die für die Nährstoffaufnahme verantwortlich sind. Wie schon erwähnt, finden sich bei Roggen ähnliche Verhältnisse wie bei Hafer

vor. Man findet bei diesem dieselbe reziproke Tendenz der GPW-Zeitkurve bei KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, und auch die dazwischenliegenden Werte für Mannit besitzen ebenso zur Zeit des Schossens ein ausgesprochenes Maximum. Es gilt hier das schon bei Hafer Gesagte. Anders liegen die Dinge bei Gerste. Während die GPW für Mannit am 35. Tag (Schossen) ein Maximum zeigen, vorher und nachher aber konstant sind, haben die Werte für KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ zu dieser Zeit niedrigere Werte, welche erst zur Zeit des Ährenschiebens einem Maximum zustreben, um später wieder zu fallen. Dabei zeigen die Kurven für KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ einen ausgesprochen symbaten Verlauf. Die Werte für Weizen zeigen eine ähnliche Tendenz: Mannit mit einem Maximum zur Zeit des Schossens, Abnahme des GPW nach dem Ährenschieben und Ansteigen gegen Ende der Vegetationsperiode. KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ liefern ziemlich nahe beieinanderliegende Werte, damit symbaten Verlauf der GPW-Zeitkurven, welche etwa während des Schossens von einem Minimum auf etwas unter der Mannitkurve liegende konstante Werte ansteigt. Für $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ wurden gegen Ende der Vegetationsperiode wieder etwas höhere Werte gefunden. Ganz allgemein kann festgestellt werden, daß die GPW der Wurzelepidermiszellen der Getreide relativ niedrig liegen, wenn man sie z. B. mit denen der Blattzellen vergleicht.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß es höchst unwahrscheinlich ist, daß die Mannitlösung außer ihrer osmotischen Wirkung noch eine, die Membraneigenschaften des Plasmas beeinflussende Wirkung besitzt und daher in den vorliegenden Versuchen wirklich nur die osmotischen Eigenschaften der Epidermis der Getreidewurzeln studiert wurden. Zur Zeit des größten Wachstums der Getreidepflanzen (Schossens) besitzen die GPW, welche mit Mannit erhalten wurden, ein Maximum. Werden zur Plasmolyse KNO_3 bzw. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ verwendet, so werden in allen Fällen andere Werte als mit Mannit erzielt, und es muß mit einer Beeinflussung der Membraneigenschaften des Plasmas gerechnet werden.

Dabei konnte bei Hafer und Roggen ein ausgesprochener Antagonismus zwischen KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ nachgewiesen werden, während Gerste und Weizen diesen nicht erkennen lassen.

Zurückkommend auf diejenige Ursache, welche zum Zustandekommen des Schädigungsfaktors im Mitscherlichschen Ertragsgesetz führt, ist es jetzt auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit möglich, eindeutige Schlüsse zu ziehen. Mitscherlich führt, wie schon erwähnt, die Schädigung der Pflanzen durch zu hohe Düngegaben (insbesondere Stickstoffdünger) auf die Lagerneigung der Getreide und auf zu hohe osmotische Werte der Bodenlösung und damit verbundene plasmolytische Schädigung der Wurzeln zurück. Nach seinen Angaben werden von der Pflanzenwurzel nur 2–5‰ Salzkonzentration in der Bodenlösung ohne plasmolytische Schädigung vertragen. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit KNO_3 stehen damit im Einklang und zeigen, daß es tatsächlich bei einer Salzkonzentration von 5‰ zu einem bestimmten Zeitpunkt, wo die Pflanze natürlicherweise den größten Nährstoffbedarf hat, nämlich während des Schossens, zur Grenzplasmolyse kommen kann, also die Grenze des „osmotischen Lebensraumes“

erreicht wird. Eine Überschreitung dieser Konzentration bedingt eine plasmolytische Schädigung der für die Nährstoffaufnahme verantwortlichen Wurzelepidermiszellen. Diese Art der Schädigung dürfte jedoch ein Sekundäreffekt sein. Aus den mit Mannit erzielten GPW, welche, wie oben erwähnt, nur die osmotischen Eigenschaften der Wurzelepidermiszellen zeigen und mit einer einzigen Ausnahme bei Hafer etwa um 1–2 at (bzw. 1,5 bis 2,5 Mol) höher liegen als die mit KNO_3 gemessenen Werte, läßt sich dies leicht ableiten. Primär ist also eine Beeinflussung der Membraneigenschaften des Plasmas bzw. der Plasmalemma durch bestimmte Salze bzw. Ionen anzunehmen, als deren Folge eine Erniedrigung des osmotischen Wertes und damit des GPW eintritt und es damit zu einer Einengung des „osmotischen Lebensraumes“ der die Nährstoffaufnahme durchführenden Zellen der Wurzel kommt. Allerdings muß auch berücksichtigt werden, daß im Boden eine Vielzahl von Ionen vorhanden ist, über deren genaues Zusammenwirken heute noch keine ausreichenden Kenntnisse vorhanden sind. Vor allen Dingen kann bis jetzt das Eintreten einer Schädigung der Nährstoffaufnahme nicht genau festgestellt werden.

Für die vorliegende Untersuchung wurde der GPW als Grenzwert für eine Schädigung angenommen, doch erwies es sich, daß der GPW eine vom Plasmolytikum stark abhängige Größe ist und eine Wirkung der einzelnen Ionen auf Plasma und Zellwand primär eintritt. In Fortsetzung der vorliegenden Arbeit wäre es Aufgabe einer weiteren umfangreichen Untersuchung, diese Einwirkung der Schädigungen auf die Nährstoffaufnahme mit Hilfe von radioaktiven Isotopen zu studieren, um endgültige Aussagen über das Zustandekommen einer Schädigung von Pflanzen bei Vorliegen zu hoher Ionenkonzentration (zu hohen Düngergaben) im Bereich der die Nährstoffaufnahme durchführenden Wurzelzellen machen zu können. Eine im übertragenen Sinne mit diesen Vorstellungen übereinstimmende Interpretation von Pflanzenschädigungen bei zu hohen Salzgaben wurde von K. Kaindl (1953), welcher sie auf Depotfettleitungen zurückführt, gegeben.

Zusammenfassung

Zur Feststellung der plasmolytischen Schädigung der die Nährstoffaufnahme durchführenden Wurzelepidermiszellen, eine Größe, welche im Mitscherlich'schen Ertragsgesetz als Schädigungsfaktor hervortritt, wurden die GPW mit Lösungsreihen von Mannit, KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ der vier Hauptgetreidearten (Hafer, Roggen, Gerste, Weizen) während der Vegetationsperiode gemessen. Am besten bewährte sich Mannit als Plasmolytikum. Es zeigte sich, daß die osmotischen Werte der jungen Wurzeln etwa bei der Konzentration von 0,15 mol. Mannit, d. i. bei etwa 3,65 at, also bei relativ niedrigen Werten liegen. Im Laufe der Entwicklung ändern sich die plasmolytischen Grenzwerte wie in den Tabellen und Kurven dargestellt. Die

Für die Anregung der vorliegenden Untersuchungen bin ich Herrn Doz. Dr. Hans Linser sehr zu Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. Karl Höfler danke ich für wertvolle Hinweise.

Diskussion der Ergebnisse zeigt, daß bereits plasmolytische Schädigungen bei Salzkonzentration in der Bodenlösung von über 3‰ eintreten können. Es ist aber offenbar, daß bei einer Stickstoff-Stoßdüngung die GPW erreicht werden und so zu einer Schädigung der Wurzeln führen können. Bei der Stadiendüngung wird diese Gefahr vermieden.

Literatur

- Abderhalden, E., 1924: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden XI/2/1, XI/4/II, Berlin.
- Baule, B., 1924: Landwirtsch. Jahrbuch 59, 541.
- Bogen, H., 1951: Über Kappenplasmolyse und Vakuolenkontraktion. *Planta* 39, 1—35.
- Biebl, R., 1948: Permeabilitätsversuche an der Kartoffelpflanze. *Öst. Bot.* 95, 129—146.
- D'Ans, J., und E. Lax, 1949: Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Berlin.
- Eggert, J., 1948: Lehrbuch der physikalischen Chemie. Zürich.
- Eucken, A., 1944: Grundriß der physikalischen Chemie, 6. Auflage.
- Frey-Wyssling, A., 1948: Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivates. New York-Amsterdam.
- Friedrich-Frekxa, H., 1940: Bei der Chromosomenkonjugation wirksame Kräfte und ihre Bedeutung für die Verdoppelung von Nukleoproteiden. *Naturwissenschaften* 28, 376.
- 1948: Eine Modellvorstellung des Vorganges der Selbstvermehrung. *Angew. Chemie* 60, 23.
- 1948: Kräfte beim Aufbau biologischer Struktureinheiten. *Fiat-Berichte* 21, 44, deutsche Ausgabe.
- Höber, R., 1947: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. Bern.
- Höfler, K., 1918: Über eine plasmolytisch-volumetrische Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Pflanzenzellen. *Denkschr. d. Wiener Akad., math.-nat. Kl.* 95, 99.
- 1920: Ein Schema für die osmotische Leistung der Pflanzenzelle. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 38, 288—298.
- 1926: Über die Zuckerpermeabilität plasmolysierter Protoplasten. *Planta* 32, 454.
- 1931: Plasmolyseverlauf und Wasserpermeabilität. *Protoplasma* 12, 564.
- 1930: Über Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse und eine Methode zur Bestimmung der Wasserpermeabilität des Protoplasten. *Jb. Bot.* 73, 300—350.
- 1939: Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. *Protoplasma* 33, 545—578.
- Huber, B., und K. Höfler, 1930: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. *Jb. Bot.* 73, 351.
- Jordan, P., 1944: Zum Problem der Eiweiß-Autokatalysen. *Naturwiss.* 32, 20.
- Kaindl, K., 1953: Versuch einer biophysikalischen Deutung des Pflanzenwachstums. *Biochim. et Biophys. Acta* 10, 241—255.
- Knudsen, L., and Ginsburg, 1921: Suggestions with respect to the measurement of osmotic pressure. *Amer. J. of Botany* 8, 164.
- Kopetz, L. M., 1951: Die Bedeutung der Stickstoffdüngung. *Die Bodenkultur* 5, 37.

- Linser, H., und K. Ka indl, 1951: Versuch einer trefferstatistischen Deutung des Mitscherlich'schen Ertragsgesetzes. Z. Pflanzenern., Düngg. u. Bodenk. 55 (98), 47—63.
- 1951: Versuch einer biophysikalischen Deutung des Mitscherlich'schen Ertragsgesetzes. Biologia Generalis 19, 349—367.
- und W. Pelikan, 1951: Zur Minderung der Größe des Schädigungsfaktors für Stickstoff im Ertragsgesetz, I. Gefäßversuch mit geteilten Stickstoffgaben. ÖSW-Bericht Nr. 16.
- 1952: Stickstoffdüngung mit hohen geteilten Gaben: I. Gefäßversuch. Z. Pflanzenern., Düngg. u. Bodenk. 58 (103), 107—120.
- und E. Primost, 1953: II. Feldversuche zu Winterweizen. Z. Pflanzenern., Düngg. u. Bodenk. 63 (108), 18—30.
- Mitscherlich, E. A., 1909: Das Gesetz des abnehmenden Bodenertrages. Landwirtschaftl. Jahrbuch 38, 537.
- 1928: Die zweite Annäherung des Wirkungsgesetzes der Wachstumsfaktoren. Z. Pflanzenern., Düngg. u. Bodenk. A 12, 273.
- 1948: Die Düngerberatung. Halle a. d. Saale.
- 1948: Die Ertragsgesetze. Vortr. u. Schriftt. d. dtsh. Akad. d. Wiss., Berlin, Heft 51.
- 1950: Bodenkunde für Landwirte, Forstwirte und Gärtner. Berlin, Hamburg.
- Molisch, H., 1936: Anatomie der Pflanze. Jena.
- Neugebauer, Th., 1939: Zur Frage der Selbstverdoppelung der Virusmoleküle. Z. Physik 114, 667.
- 1939: Über eine physikalische Theorie der Selbstreproduktion der Viren. Z. Physik 40, 406.
- Philipp, L., 1953: Ein Beitrag zur Morphologie der Wurzel von *Avena sativa*. Z. Acker- u. Pflanzenbau 97, 71—100.
- Rajewsky, B., 1948: Grundlagen der Treffertheorie d. biol. Strahlenwirkung. Fiat-Berichte 21, 9.
- Sommermeyer, K., und V. Dehlinger, 1939: Beiträge zur Diskussion eines Gen-Modells. Z. Physik 40, 67.
- Schmidt, M., 1937: Über die Abhängigkeit des osmotischen Koeffizienten vom chemischen Bau der Ionen. Diss. Würzburg.
- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze (Pflanzenphysiologische Praktika, Bd. II), 2. Auflage. Berlin.
- Timofeeff-Ressovsky, N. W., 1949: Das Trefferprinzip in der Biologie. Leipzig.
- Ursprung, A., und G. Blum, 1916: Über die Verteilung des osmotischen Wertes in der Pflanze. Ber. dtsh. Bot. Ges. 34, 88—104.
- 1932: Osmotische Zustandsgrößen. Landw. Naturw. 7, 493—510.
- 1939: Die Messung der osmotischen Zustandsgrößen pflanzlicher Zellen und Gewebe. Abderhalden, E., Handbuch der biol. Arbeitsmethoden XI/4/II, 1109. Berlin, Wien.
- Walter, H., 1952: Kritisches zur Darstellung der osmotischen Zustandsgrößen in verschiedenen Lehrbüchern der Botanik. Planta 40, 530.
- 1947: Die Grundlagen des Pflanzenlebens. Stuttgart (Ludwigsburg).
- Weber, F., und Hohenegger, 1923: Reversible Viskositäts-erhöhung des Protoplasmas bei Kälte. Ber. dtsh. Bot. Ges. 41, 198.
- 1927: Vitale Blattinfiltration. Protoplasma 1, 581.
- 1929: Plasmolysezeit und Lichteinwirkung. Protoplasma 7, 256.
- 1930: Vakuolenkontraktion vital gefärbter *Elodea*-Zellen. Protoplasma 9, 106.
- 1932: Plasmolysepermeabilität bei Kälte. Protoplasma 15, 517.

Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen

Von

Assunta Flasch

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 25. Oktober 1954)

Im Zuge von Untersuchungen über die Festigkeit der Farbstoffbindung im Zellsaft, die zur Zeit noch nicht abgeschlossen sind, konnte ich feststellen, daß sich einige, mit Rhodamin B gefärbte Objekte in Leitungswasser entfärben, so z. B. die Zellen der unteren Blattepidermis von *Hedera helix*, *Gentiana cruciata*, *Caltha palustris* u. v. a., andere Objekte, wie *Aspidium falcatum*, *Azalea indica* und *Paeonia officinalis*, hingegen nicht (vgl. Höfler 1949 a, S. 59, Waldheim 1950 und 1955).

In diesem Zusammenhange untersuchte ich auf Anregung von Herrn Dr. H. Kinzel auch die Wirkung einer rasch permeierenden, organischen Base auf vitalgefärbte Zellen. Als Base diente das Coffein, als Farbstoffe dienten Rhodamin B und Akridinorange. Die dabei erhaltenen Resultate waren so auffällig, daß über diese Teilergebnisse hier kurz berichtet werden soll.

Das Coffein wurde für die Zellphysiologie vor allem durch die umfassenden Untersuchungen von Overton (1895, 1899) interessant. Er stellte fest, daß diese Base außerordentlich leicht durch das Protoplasma in den Zellsaft vordringt und brachte diese Eigenschaft mit ihrer hohen Lipoidlöslichkeit in Zusammenhang (vgl. auch Höber 1926). Van Wisselingh (1915) kombinierte diese Eigenschaft des Coffeins mit seiner Fähigkeit, in Gerbstofflösungen Niederschläge hervorzurufen, zu einer eleganten Methode, den in den Zellsäften von *Spirogyra* enthaltenen Gerbstoff nachzuweisen: Legt man *Spirogyra*-Fäden in Lösungen von Coffein, dann entsteht oft schon nach wenigen Sekunden in den Zellsäften ein mehr oder weniger reichlicher Tröpfchenniederschlag, der nach Übertragen der Algenfäden in Wasser nach einiger Zeit wieder verschwindet, ohne daß die Alge dadurch irgendwie geschädigt wurde. Diese Methode wurde dann auf viele andere Objekte ausgedehnt und ist heute eines der beliebtesten Verfahren

zum Gerbstoffnachweis in lebenden Zellen (vgl. auch Molisch 1923 und Strugger 1949).

Strugger (1937, 1938a, b) und Drawert (1937 b, 1939 b, 1941 a) haben in neuerer Zeit das Rhodamin B sehr eingehend untersucht. Dieser Vitalfarbstoff ist im weiten pH-Bereich von pH 2 bis um pH 11 undissoziiert und scheint erst unter pH 2 zu ionisieren. Er ist also elektroneutral. Strugger konnte nachweisen, daß das Rhodamin B einer der unschädlichsten Vitalfarbstoffe ist und überdies als Plasmavitalfarbstoff verwendet werden kann, indem er mit Rhodamin B erstmalig eine Lebendfärbung der Plastiden erzielen konnte (1937 a, b). Auch geringere Farbstoffkonzentrationen können durch Beobachtung im UV-Licht noch sichtbar gemacht werden. Da also das Rhodamin B elektroneutral ist, kann dieser Farbstoff nur von vollen Zellsäften im Sinne von Höfler (1947) gespeichert werden. In den vollen Zellsäften kommt nach Höfler die vitale Färbung durch Löslichkeitsspeicherung unter gleichzeitiger Bindung des endosmierenden Farbstoffes mit zelleigenen Stoffen zustande. In den leeren Zellsäften beruht die Zellsaftfärbung auf der Speicherung von Farbkationen.

Drawert (1939, S. 384) unterscheidet ferner an den Epidermen treibender Zwiebeln von *Allium cepa* bei Färbung mit Rhodamin B verschiedene Farbstoffspeicherungstypen, nämlich Entmischungstropfen oder Entmischungskugeln in der Außenepidermis sowie kleine nicht verschmelzende Körnchen in der Innenepidermis. Krümelspeicherung findet sich häufig in gerbstoffhaltigen Zellsäften; solche zeigt z. B. die untere Blattepidermis von *Hedera helix*, während Entmischungskugeln in der Epidermis von *Caltha palustris* auftreten.

Als zweiten Farbstoff wählte ich Akridinorange, das von Strugger (1940) erstmalig als Vitalfarbstoff verwendet wurde. Die Bedeutung dieses Farbstoffes liegt, wie Höfler (1947 a, b) feststellte, darin, daß mit Hilfe des Akridinorange volle und leere Zellsäfte direkt fluoreszenzoptisch unterschieden werden können. „Beim Akridinorange sind im physiologisch wichtigen pH-Bereich in breiter Zone permeierfähige (Basen- oder Salz-) Moleküle und adsorbierfähige Kationen nebeneinander zugegen, und dieser Umstand verleiht dem Farbstoff seine bevorzugte Fähigkeit zur prächtig metachromatischen Fluorochromfärbung pflanzlicher Zellen“ (Höfler 1949, S. 49). Volle Zellsäfte, die die Akridinorangemoleküle chemisch binden, fluoreszieren im UV-Licht grün, leere Zellsäfte, bei denen es bloß zu einer Ionenanreicherung kommt, zeigen rote Fluoreszenz und sind durch eine verdünnte NH_3 -Lösung entfärbbar. Der Ammoniak endosmiert leicht durch das lebende Plasma, macht die vordem sauren Zellsäfte alkalisch und wandelt damit die rot leuchtenden Akridinorangeionen in permeierfähige Moleküle, die rapid exosmieren. Im Gegensatz dazu werden grün fluoreszierende Zellsäfte durch NH_3 nicht entfärbt, denn der im Zellsaft chemisch gebundene Farbstoff wird beim Eintritt alkalischer Reaktion nicht zu permeierfähigen Farbmolekülen rückgewandelt (Höfler 1947).

I. Die Wirkung des Coffeins auf rhodamingefärbte Zellen

A. Diffuse Speicherung

Die untere Blattepidermis von *Primula obconica* wurde vorsichtig abgezogen und in eine Rhodamin-B-Lösung 1:5000 gelegt. Nach 10 Minuten wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser ausgewaschen und unter dem Mikroskop untersucht. Die Epidermiszellen zeigten im Hellfeld diffuse, violette Vakuolenfärbung, im Fluoreszenzmikroskop intensive gelbrote Fluoreszenz.

Nun wurden einige Schnitte in Leitungswasser oder in dest. H₂O gelegt, einige in eine 1%ige Coffeinelösung. Während die Schnitte, die in Wasser gelegt wurden, nach 24 Stunden noch eine schwache violette Vakuolenfärbung erkennen ließen, sind die in Coffein gelegten Schnitte nach 5 Stunden bereits vollkommen entfärbt.

Eine eigenartige Wirkung übt das Coffein auf die Idioblasten der inneren Zwiebelepidermis von *Coldicum autumnale* aus. Färbt man die Innenepidermis von *Coldicum autumnale* in Rhodamin B 1:5000 10 Minuten lang an, so färben sich einzelne Idioblasten intensiv diffus violett an (Scheidl 1954), die übrigen Epidermiszellen, die leere Zellsäfte besitzen, lassen im Fluoreszenzmikroskop nur eine schwache gelbe Plasmafluoreszenz erkennen. In Wasser lassen sich diese Idioblasten nicht entfärben, sondern sie bleiben unverändert erhalten. Legt man jedoch die gefärbte Epidermis in eine 1%ige Coffeinelösung, so treten nach wenigen Minuten in den Idioblasten blasen- bzw. netzförmige Gebilde auf, die auch nach tagelangem Liegen in der Coffeinelösung noch erhalten sind, ohne daß es zu einer Entfärbung kommt. An ungefärbten Epidermen läßt sich bei Einwirkung von Coffein diese Erscheinung nicht beobachten.

B. Tröpfchenspeicherung

Schnitte der Außenepidermis von *Allium cepa* wurden in einer Rhodamin-B-Lösung 1:5000 10 Minuten lang gefärbt. Es tritt diffuse violette Vakuolenfärbung auf und außerdem kommt es in vielen Zellen zur Bildung mehrerer rubinroter Entmischungskugeln (Abb. 1a)¹. Im Fluoreszenzmikroskop zeigen die Zellen gelbrote Fluoreszenz, die Entmischungskugeln fluoreszieren dunkelrot. Werden diese Schnitte in Wasser gelegt, so bleiben die Entmischungskugeln, die nach einiger Zeit meist zu einer größeren Kugel zusammenfließen, noch 24 Stunden erhalten, die violette Diffusfärbung ist auch nach 48 Stunden noch schwach sichtbar, desgleichen auch noch die gelbe Fluoreszenz im UV-Licht.

Legt man jedoch die gefärbten Schnitte nicht in Wasser, sondern in eine 1%ige Coffeinelösung, so lösen sich die Entmischungskugeln binnen weniger Minuten auf. Dieser Vorgang läßt sich unter dem Mikroskop beobachten, da nach 5 Minuten in fast allen Zellen nur

¹ Für die Herstellung der Photographien sei Herrn Dr. W. Url herzlich gedankt.

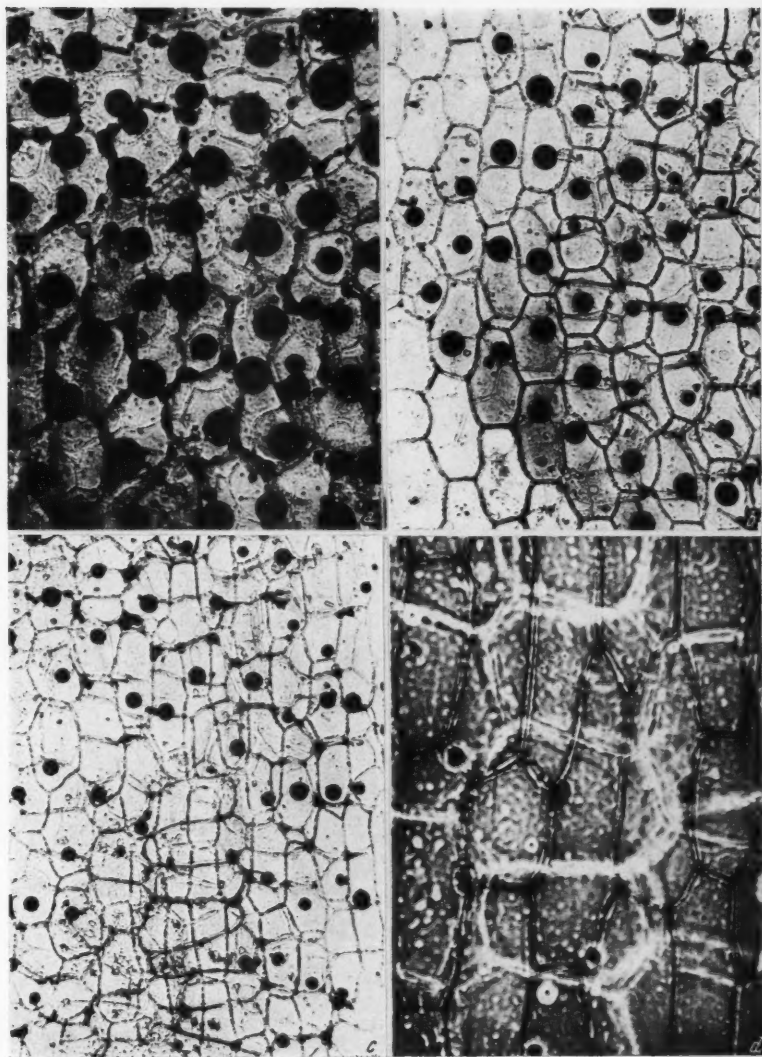


Abb. 1 a—d. Außenepidermis von *Allium cepa*. a) Nach 10 Minuten langer Färbung mit Rhodamin B 1:5000, große Entmischungskugeln in den Zellen. b) Nach 5 Min. langer Einwirkung einer 1%igen Coffeinelösung, die Entmischungskugeln sind bedeutend kleiner. c) 2 Min. später, die Entmischungskugeln kleiner, aber noch sichtbar. d) Nach 10 Min. langer Coffeinbehandlung, Entmischungskugeln aufgelöst.

mehr diffuse violette Vakuolenfärbung sichtbar ist, die aber auch bald schwächer wird. (Die Abbildungen 1 b, c, d zeigen die verschiedenen Stadien der Entfärbung durch Coffein eines mit Rhodamin B gefärbten Schnittes der Außenepidermis von *Allium cepa*.) Die violette Diffusfärbung der Vakuolen bleibt im Hellfeldmikroskop noch ungefähr 4–5 Stunden sichtbar, während eine schwache gelbe Fluoreszenz noch länger anhält. Sie erlischt aber wesentlich früher als in den Zellen, die nicht mit Coffein behandelt wurden.

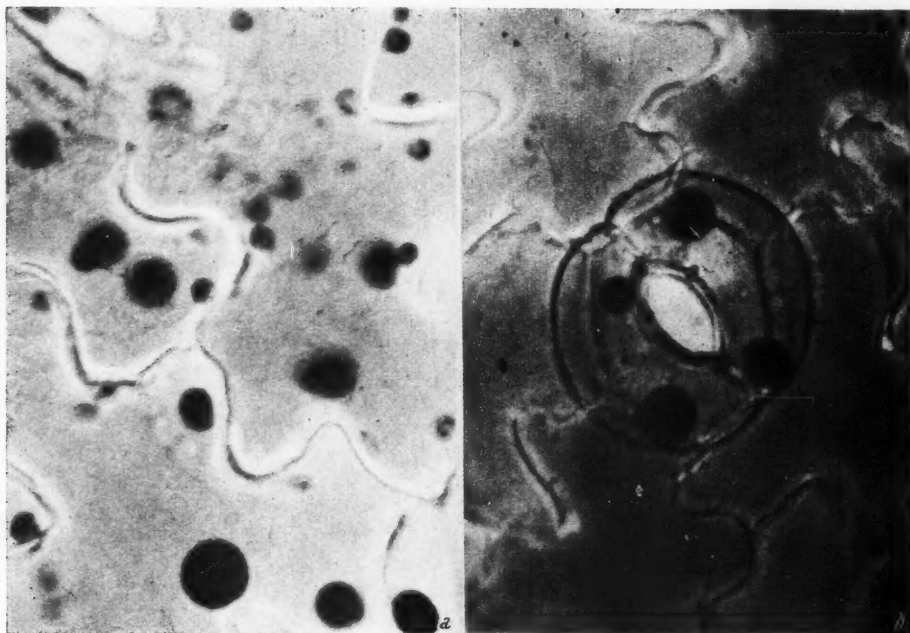


Abb. 2 a. *Caltha palustris*, untere Blattepidermis 10 Min. in Rhodamin B 1 : 5000 gefärbt. Diffuse Vakuolenfärbung und große Entmischungskugeln in den Zellen. b: 10 Min. gefärbt und 15 Min. mit Coffein behandelt. Entmischungskugeln in den Epidermiszellen aufgelöst, nur in den Schließzellen der Spaltöffnungen noch erhalten.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch an anderen Objekten gemacht werden.

Zellen der unteren Blattepidermis von *Caltha palustris*, 10 Minuten in Rhodamin B 1 : 5000 gefärbt, zeigen diffuse violette Vakuolenfärbung mit roten Entmischungskugeln (Abb. 2 a). Werden diese Schnitte in Wasser gelegt, so sind die Entmischungskugeln nach 5 Stunden noch zu beobachten und eine schwache violette Diffusfärbung ist auch nach 24 Stunden noch sichtbar. Die gelbe Fluoreszenz hält noch länger an.

In eine 1%ige Coffeinelösung gebracht, lösen sich die roten Entmischungskugeln der Zellen schon nach wenigen Minuten auf, nur die Entmischungskugeln in den Schließzellen der Spaltöffnungen bleiben länger erhalten (Abb. 2 b). Nach ungefähr 2 Stunden sind die Epidermiszellen bereits entfärbt, nur einzelne Schließzellen sind noch blaß violett. Im Fluoreszenzmikroskop ist noch eine schwache gelbe Fluoreszenz zu beobachten, die nur in den Schließzellen intensiver ist. Doch nach 4—5 Stunden ist auch diese gelbe Fluoreszenz erloschen.

Wesentlich rascher entfärbend wirkt das Coffein auf vitalgefärbte Zellen der unteren Blattepidermis von *Buxus sempervirens*, die 15 Minuten in einer Rhodamin-B-Lösung 1:5000 gefärbt wurden. Bei Färbung in Rhodamin B 1:5000 zeigen die Zellen nach 15 Minuten diffuse violette Vakuolenfärbung und außerdem treten in einigen Zellen auch dunkelrote Entmischungskugeln auf (vgl. Flasch und Kinzel 1954). Bei Einwirkung einer 1%igen Coffeinelösung auf diese Schnitte verschwinden die Entmischungskugeln schlagartig, nur die Diffusfärbung ist noch einige Zeit (ca. 15—20 Minuten) sichtbar. In Wasser geht die Entfärbung wesentlich langsamer vor sich, erst nach 4—5 Stunden Wasserbad sind die Zellen vollkommen farblos.

C. Krümel Speicherung

Flächenschnitte der Blattunterseite von *Azalea indica*, *Rhus sp.* und *Paonia arborea* zeigen nach 10 Minuten langer Färbung in Rhodamin B 1:5000 in den Zellen der Epidermis und Subepidermis reichlich blaue Farbstoffkrümel, die rot fluoreszieren. Auch nach tagelangem Liegen in Wasser bleiben diese Krümel in den Zellen erhalten. Legt man die gefärbten Schnitte in eine 1%ige Coffeinelösung, so bilden sich in den lebenden Zellen blau-violette Kugeln von verschiedener Größe, die rot fluoreszieren. Viele dieser Kugeln lassen eine doppelte Kontur erkennen. Außerdem treten in den Zellen auch kleinere farblose Kugeln auf, die sich anfangs in lebhafter BMB befinden und allmählich zur Ruhe kommen. Auch bei längerem Liegen in der Coffeinelösung tritt nun keine Änderung mehr ein. In den toten Zellen bleiben die Krümel unverändert erhalten, und es bilden sich keine Kugeln.

Läßt man auf ungefärbte Schnitte der Blattunterseite dieser Objekte die Coffeinelösung einwirken, so treten in den Zellen zahlreiche kleine Kügelchen in lebhafter BMB auf, die die Zelle fast vollkommen ausfüllen. Nach einiger Zeit fließen sie zu etwas größeren Kugeln zusammen, legen sich aneinander und zeigen nach etwa 10 Minuten keine BMB mehr. Diese Erscheinung läßt vermutlich auf Gerbstoffgehalt der Zellen schließen.

Anders ist jedoch die Wirkung des Coffeins auf die Krümel Speicherung bei *Hedera helix*.

Die Zellen der Blattunterseite von *Hedera helix* zeigen bei Färbung mit Rhodamin B 1:5000 diffuse violette Vakuolenfärbung, und in vielen Zellen, besonders in den Schließzellen der Spaltöffnungen treten blaue Farbstoffkrümel auf. Legt man die Schnitte in eine 1%ige Coffeinelösung, so sind nach 20 Minuten fast alle Farbstoffkrümel verschwunden und es

ist nur mehr eine violette Diffusfärbung der Vakuolen sichtbar. In Wasser hingegen sind die Krümel nach gleicher Zeit noch unverändert erhalten. Nach fünf Stunden sind die Schnitte in der Coffeinelösung bereits entfärbt. Die Schnitte, die in Wasser liegen, lassen nach 24 Stunden noch eine blaß-violette diffuse Vakuolenfärbung erkennen.

II. Die Wirkung des Coffeins auf Zellen, die mit Acridinorange gefärbt wurden

Schnitte von verschiedenen Objekten wurden mit einer Akridinorange-farblösung von pH 8,0 10 Minuten gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Auf die Bedeutung des Farbstoffes Akridinorange, vor allem zur Unterscheidung voller und leerer Zellsäfte, wurde bereits einleitend hingewiesen. Leere Zellsäfte sind in Gewebszellen höherer Pflanzen im allgemeinen seltener als volle; doch zeigten bei meinen Versuchen die Zellen von Zwiebelinnenepidermen oder von Schnitten aus dem Stengel- oder Blattparenchym folgender Objekte die für leere Zellsäfte (Höfler 1947, 1949 b) charakteristische rote Fluoreszenz:

<i>Agapanthus umbellatus</i>	Blattparenchym
<i>Allium cepa</i>	Zwiebelinnenepidermis
<i>Allium sativum</i>	Zwiebelinnenepidermis
<i>Amicia zygomeris</i>	Stengelparenchym
<i>Antirrhinum majus</i>	Stengelparenchym
<i>Apium graveolens</i>	Stengelparenchym
<i>Aspidistra elatior</i>	Stengelparenchym
<i>Aster chinensis</i>	Stengelparenchym
<i>Boehmeria nivea</i>	Stengelparenchym
<i>Calla (Zantedeschia aethiopica)</i>	Stengelparenchym
<i>Campanula rapunculoides</i>	Stengelparenchym
<i>Campanula sibirica</i>	Stengelparenchym
<i>Chlorophytum Sternbergii</i>	Stengelparenchym
<i>Colchicum autumnale</i>	Stengelparenchym und Zwiebelinnen- epidermis
<i>Convallaria majalis</i>	Stengelparenchym
<i>Coprosma Baueri</i>	Stengelparenchym
<i>Daucus carota</i>	Stengelparenchym
<i>Dianthus barbatus</i>	Stengelparenchym
<i>Dimorphoteca aurantiaca</i>	Stengelparenchym
<i>Galanthus nivalis</i>	Stengelparenchym
<i>Hyacinthus orientalis</i>	Stengelparenchym und Zwiebelinnen- epidermis
<i>Hypeastrum hybr.</i>	Blattparenchym
<i>Iris florentina</i>	Stengelparenchym
<i>Lamium purpureum</i>	Stengelparenchym
<i>Lamium maculatum</i>	Stengelparenchym

<i>Leucojum vernum</i>	Stengelparenchym
<i>Leonurus cardiaca</i>	Stengelparenchym
<i>Orchis maculata</i>	Stengelparenchym und untere Blatt- epidermis
<i>Paeonia arborea</i>	Stengelparenchym
<i>Phormium tenax</i>	Blattparenchym
<i>Raphanus sativus</i>	Stengelparenchym
<i>Ruellia blumei</i>	Stengelparenchym
<i>Sedum spectabile</i>	Stengelparenchym
<i>Senecio vulgaris</i>	Stengelparenchym
<i>Tulipa gesneriana</i>	Stengelparenchym und Zwiebelinnen- epidermis
<i>Veratrum nigrum</i>	Stengelparenchym
<i>Viola tricolor</i>	Stengelparenchym

Die Innenepidermis von *Allium cepa* wurde 10 Minuten in einer Akridinorangefärbung 1:10.000 von pH 8,0 gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop zeigten die Zellen intensive rote Fluoreszenz, die Zellkerne fluoreszierten grün. Werden nun dem Präparat einige Tropfen einer 1%igen Coffeinelösung zugesetzt, so läßt sich im Fluoreszenzmikroskop folgendes beobachten:

Nach 2 bis 5 Minuten tritt in den Randzellen beginnend ein allmählicher Farbumschlag der Fluoreszenz auf. Die vordem rot fluoreszierenden Zellen zeigen nun grüne Fluoreszenz. In den jetzt lichtgrün fluoreszierenden Zellen hebt sich der Zellkern etwas dunkler ab. Setzt man nun dem Präparat einige Tropfen der ungefärbten coffeinfreien Pufferlösung von pH 8,0 zu, so tritt wieder ein allmählicher Farbumschlag auf, und zwar zeigt sich neuerlich die rote Fluoreszenz. Dieser Vorgang läßt sich beliebig oft wiederholen, woraus man die Unschädlichkeit des Coffeins für die lebende Pflanzenzelle erkennen kann.

Plasmolysiert man die durch die Coffeinbehandlung grün fluoreszierenden Zellen mit 1 mol Traubenzucker oder mit 1 mol KNO_3 , so ändern viele Zellen ihre Farbe und fluoreszieren wieder rot, einige jedoch bleiben auch weiterhin grün.

Bei gleicher Behandlung anderer Objekte mit leeren Zellsäften lassen sich analoge Erscheinungen feststellen.

Bringt man Zellen, die mit Akridinorange gefärbt im Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszieren, also volle Zellsäfte besitzen, in eine 1%ige Coffeinelösung, so tritt keinerlei Veränderung ein. Die grüne Fluoreszenz bleibt erhalten und ist nach 48 Stunden noch sichtbar.

Zellen, die das Akridinorange in Form von kleinen, rot fluoreszierenden Tröpfchen speichern, so z. B. die Zellen des Stengelparenchyms von *Piper nigrum*, zeigen in einer 1%igen Coffeinelösung folgendes: die Tröpfchen lösen sich binnen kurzer Zeit auf, die Zellen zeigen nun grüne Fluoreszenz, die lange Zeit erhalten bleibt.

Zusammenfassung

Die vorliegenden Versuche haben gezeigt, daß das Coffein auf Zellen, die mit Rhodamin B diffus angefärbt worden sind, rasch entfärbend wirkt. Bei Tröpfchenspeicherung bewirkt das Coffein rasche Auflösung der Tröpfchen. In Zellen, in denen Krümlerspeicherung auftritt, bilden sich bei einigen Objekten bei Einwirkung von Coffein kugelförmige Gebilde, bei anderen Objekten löst das Coffein die Krümel auf. Auch bei einigen diffus gefärbten Objekten, die sich durch Dauerwässerung nicht entfärben lassen, bewirkt das Coffein die Bildung von kugelförmigen Aggregaten.

Mit Akridinorange gefärbte Schnitte, die im Fluoreszenzmikroskop rot fluoreszieren, zeigen bei Zusatz einer schwachen Coffeinelösung einen Farbumschlag der Fluoreszenz nach grün. Bringt man die Schnitte wieder in die farblose, coffeinfreie Pufferlösung, so tritt, indem das Coffein exosmiert, wieder die ursprüngliche rote Fluoreszenz auf. Auch zeigen durch Coffeinbehandlung grün fluoreszierende Zellen nach erfolgter Plasmolyse meist wieder rote Fluoreszenz.

Volle Zellsäfte, die mit Akridinorange gefärbt grün fluoreszieren, zeigen bei Zusatz von Coffein keine Änderung. Bewirkt das Akridinorange jedoch die Bildung von Entmischungströpfchen, so werden diese durch Coffein aufgelöst.

Literatur

- Drawert, H., 1957 b: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* 152, 91.
- 1939 b: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. *Planta* 29, 376.
- 1941 a: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* 155, 21.
- Flasch, A., und H. Kinzel, 1954: Rasche Bildung von Entmischungskörpern in Zellsäften von *Buxus sempervirens*. *Protoplasma* 44, 266.
- Höber, R., 1926: *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*. Leipzig.
- Höfler, K., 1947 a: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Speicherung? *Mikroskopie* 2, 13.
- 1947 b: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. *Sber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. I*, 156, 585.
- 1948: Neue Ergebnisse der Vital- und Fluoreszenzfärbung. *Wiss. Mitt. d. Pharm. Forsch. Inst. d. österr. Ap. Ver.*, 1. Jg., S. 23.
- 1949 a: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. *Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie* 1. Sonderband Mikroskopie, Wien.
- 1949 b: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biol. gen.* 19, 90.
- Molisch, H., 1923: *Mikrochemie der Pflanze*. Jena, 3. Aufl.
- Overton, E., 1895: Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle. *Vjschr. Naturf. Ges. Zürich* 40, 159.
- 1899: Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Ebenda* 44, 88.
- Scheidt, W., 1955: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum*. *Protoplasma* 44, 336.

- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin. 2. Aufl.
- 1937: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Chloroplasten mit Rhodaminen. *Flora* 131, 113, 324.
 - 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoresceinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora* 132, 253.
 - 1938: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6 G. *Protoplasma* 30, 85.
 - 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena. Naturw.* 73, 97.
- Waldheim, W., 1949: Differentialfärbung mit Rhodamin B. Darstellung der Gerbstoffzellen im *Carex*-Blatt. *Mikroskopie* 4, 46.
- 1955: Vitalfärbestudien mit Rhodamin B. Dissertation der philosophischen Fakultät Wien.
- Wisselingh, C. van, 1915: Über den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze und über seine physiologische Bedeutung. *Beih. z. Bot. Zentralbl.* 32, 155.

Ein Versuch zur quantitativen Auswertung der Plasmolyseform- und -zeitmethode

Von

Gerhard Schaefer

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 22. November 1954)

Inhalt:

	Seite
1. Historischer Überblick	422
2. Zusammenstellung der wichtigsten plasmolysezeitverändernden Faktoren	423
3. Beziehungen zwischen Plasmolyseform und Plasmolysezeit (Abrundungskoeffizient)	425
4. Praktische Beispiele	429
5. Zusammenfassung	434

1. Historischer Überblick

Seit der ersten Veröffentlichung Webers (1924) über den Zusammenhang zwischen Plasmolyseform und Viskosität des Plasmas haben verschiedene Autoren immer wieder versucht, den Vorgang der Plasmolyse und seine Beziehungen zur Viskosität quantitativ zu erfassen. Der grundlegende Schritt auf diesem Wege war die Einführung der „Plasmolysezeit“ vor nunmehr 25 Jahren durch Weber (1929), worunter die Zeit vom Einlegen in das Plasmolytikum bis zur Erreichung der konvexen Form des Protoplasten verstanden werden soll. Diese Größe wurde seitdem oft als Maß der Plasmaviskosität angesehen, da sie mit den Ergebnissen der Zentrifugenmethode und anderer Meßverfahren oftmals in gutem Einklang stand. Bedenken gegen ihre Anwendung als Viskositätsmaß äußerten aber schon frühzeitig el Derry (1930), Cholodny und Sankewitsch (1934), Borriß (1938) und Ruge (1940). Sie weisen darauf hin, daß die Viskosität nur einer von mehreren Faktoren ist, die zusammen die Plasmolysezeit bestimmen, daß also ein direkter Schluß von dem Verhalten der Plasmolysezeit auf das Verhalten der Viskosität nicht ohne weiteres möglich ist. — Einen anderen Versuch zur quantitativen Erfassung der Plasmakonsistenz mit Hilfe der Plasmolyse unternahmen Cholodny und

Sankewitsch (1934), welche als erste die Plasmolyseform zahlenmäßig auszudrücken suchten, indem sie das Verhältnis der im optischen Querschnitt erscheinenden abgelösten Plasmalinie zur entsprechenden Wandlänge bildeten. Auf ihre Arbeit wird weiter unten noch näher eingegangen. — Als Versuch einer Präzisierung der Plasmolysezeit-Methode ist der von Schmidt, Diwald und Stocker (1940) gemachte Vorschlag anzusehen, an Stelle der oft nur sehr ungenau zu bestimmenden Endplasmolysezeit die sogenannte „Halbwertszeit“ zu ermitteln, d. h. die Zeit, in der die Hälfte aller Zellen konvex plasmolysiert ist. Da diese Größe mit Hilfe einer linearen Interpolationsgleichung aus zwei benachbarten Meßwerten errechnet wird, ist es nötig, mit einer großen Zahl von Zellen aus homogenen Geweben zu arbeiten, da sonst die Interpolation zu ungenau wird. Die Möglichkeit hierzu ist aber nicht immer gegeben, so daß diese Methode nur bedingt verwendbar ist. Sie bietet zudem nur bei langen Plasmolysezeiten (größer als 1 Std.) wirkliche Vorteile; bei schnellerer Abrundung des Protoplasten ist die Bestimmung der Endplasmolysezeit mit hinreichender Genauigkeit möglich.

Die genannten Versuche, den Vorgang der Plasmolyse exakt auszuwerten, erstreckten sich bisher jeweils auf die zahlenmäßige Bestimmung einer einzelnen Größe, entweder der Plasmolyseform oder der Plasmolysezeit. Sie beschrieben somit Teilphänomene des gesamten Vorganges, die keinesfalls immer maßgeblich durch die sogenannte „Viskosität“ hervorgerufen werden. Wenn auch in den Probeversuchen vieler Autoren, z. B. Weber (1924, 1929), Weber und Hohenegger (1923), Timmel (1927), Mißbach (1927), Ruge (1940), Currier (1949) u. a., Plasmolyse und andere Methoden der Viskositätsbestimmung übereinstimmende Resultate ergeben, so darf doch nicht übersehen werden, daß eine beträchtliche Anzahl von Untersuchungen eine Diskrepanz zwischen den Resultaten der Plasmolyse und denen anderer Meßmethoden enthält, worauf neuerdings besonders Virgin (1951) hinweist. In eigenen Versuchen konnte ebenfalls solch ein abweichendes Verhalten festgestellt werden. Dieser Sachverhalt sowie die von uns des öfteren gemachte Beobachtung, daß unter bestimmten Bedingungen sogar selbst zwischen den beiden Plasmolysegrößen „Form“ und „Zeit“ deutliche Widersprüche auftreten, veranlaßten uns zur erneuten Untersuchung der Frage, welche Faktoren insgesamt die Plasmolysezeit bestimmen, welche von ihnen für bestimmte Versuchsbedingungen als konstant angesehen werden können und auf welche Weise ein quantitativer Zusammenhang zwischen Plasmolyseform und -zeit (im folgenden zur Abkürzung mit *PF* und *PZ* bezeichnet) gefunden werden kann.

2. Zusammenstellung der wichtigsten plasmolysezeitverändernden Faktoren

1. Der Diffusionswiderstand des umgebenden Gewebes gegen das Eindringen des Plasmolytikums beeinflusst die Grenzplasmolysezeit und damit auch die *PZ*. Er ist nur bei Wasserpflanzen wegen der geringen Ausbildung einer Cuticula im allgemeinen unbedeutend und nur

bei zentralsymmetrisch gewachsenen Geweben konstant, so daß er in den genannten Fällen bei der Bewertung der *PZ* vernachlässigt werden kann.

2. Der osmotische Wert des Zellsaftes hat einen starken Einfluß auf die *PZ*, da er die Geschwindigkeit der Vakuolenschrumpfung und damit auch die Geschwindigkeit der Abkugelung verändert, wie Untersuchungen von el Derry (1930) zeigen. Eigene Beobachtungen an *Lemna minor* führten in Übereinstimmung mit Arbeiten von Fischer (1948) zu dem Ergebnis, daß Veränderungen des osmotischen Wertes in dem Intervall von etwa 0,7 bis 1,1 des Normalwertes keinen meßbaren Unterschied in der *PZ* hervorrufen. Werden nur solche Versuche gewertet, bei denen der osmotische Wert innerhalb dieser Grenzen bleibt, so kann er als plasmolysezeitverändernder Faktor vernachlässigt werden.

3. Die „Viskosität“ des Plasmas, die sich aus der sogenannten Strukturviskosität und der echten physikalischen Viskosität der strukturlösen Flüssigkeiten des Plasmas zusammensetzt, bildet den Widerstand gegen die Abrundung des Protoplasten und bestimmt somit zu einem wesentlichen Teil die Veränderungen der *PZ*.

4. Die Permeabilität der Plasmahaut, die den Plasmolysegrad vergrößert und dadurch die Abrundungsgeschwindigkeit beeinflusst (vgl. Punkt 2), kann für Glukose außer Betracht bleiben, da sie hierfür verschwindend gering ist. Eine eventuell stattfindende, im gleichen Sinne wirkende „metaosmotische“ Wasseraufnahme (Bogen und Prell 1953) wirkt sich bei kurzen Plasmolysezeiten (weniger als 1 Std.) im allgemeinen nicht aus, muß aber bei längeren Zeiten berücksichtigt werden.

5. Die Wandhaftung der äußeren Plasmaschicht verändert die *PF* und somit weitgehend auch die *PZ*. Es ist schwer, ihre Auswirkung auf die *PZ* von der Wirkung der Viskosität zu trennen. Nach Ruge (1940) soll die Viskosität des „Ektoplasmas“ der ausschlaggebende Faktor für die Veränderungen der *PF* und *PZ* sein, während die Zentrifugen-Methode allein die Viskosität des Endoplasmas messe. Dieses Argument dürfte in vielen Fällen berechtigt sein.

6. Die „Plasmaspannung“, die sich aus den Grenzflächenspannungen der inneren und äußeren Plasmagrenzschicht und eventuell im Inneren des Plasmas vorhandenen strukturellen Spannungen zusammensetzt, stellt den Antrieb für die Abrundung des Protoplasten dar und hat somit auf die *PZ* einen erheblichen Einfluß. Versuche Czapeks (1911), die Oberflächenspannung des Plasmas direkt zu bestimmen, ergaben bei verschiedenen Objekten einen Wert von etwa 0,68 des Wassers. Dieser Wert konnte durch Narkotika (allgemein: oberflächenaktive Stoffe) und Säuren beträchtlich herabgesetzt werden. Wenngleich diese Ergebnisse nicht verallgemeinert werden dürfen, so zeigen sie doch genau so wie Untersuchungen von Langmuir (1939) und Guest und Lewis (1939) an Modellen, daß die Grenzflächenspannung des Zytoplasmas durch Außenwirkungen unter Umständen wesentlich beeinflusst werden kann. Seifriz (1923) nahm auf Grund von Untersuchungen an Hechtschen Fäden eine erniedrigte Oberflächenspannung sogar als alleinige Ursache der kon-

vexen *PF* an. Leider entzieht sich die Plasmaspannung gegenwärtig noch unseren Messungen, so daß sie beim Aufstellen quantitativer Plasmolysegesetze vorläufig noch als unbekannte Größe eingesetzt werden muß.

7. Die chemische Natur des Plasmolytikums vermag sowohl die Grenzflächenspannung als auch die Viskosität des Plasmas zu verändern und hat daher einen entscheidenden Einfluß auf die *PZ*, wie Untersuchungen von Beck (1927), Timmel (1927), Barth (1929), Cholodny und Sankewitsch (1934) u. a. demonstrieren. Es empfiehlt sich daher, als Plasmolytikum immer die gleiche Lösung zu verwenden, so daß Unterschiede in *PF* und *PZ* nicht auf unterschiedliche Wirkungen des Plasmolytikums zurückzuführen sind.

8. Die Dicke der Plasmaschicht ist von großer Bedeutung für die *PZ*, da sie wie die Viskosität den Widerstand gegen jegliche Deformation, also auch gegen die Abrundung des Protoplasten bestimmt. Bei Viskositätsmessungen mit Hilfe der Plasmolysezeitmethode muß also die Plasmadicke unbedingt mitberücksichtigt werden.

Bei Auswahl geeigneter Versuchsobjekte (Wasserpflanzen, konzentrische Organe, z. B. die Wurzel von *Lemna minor*) und geeigneter Versuchsbedingungen (weitgehende Konstanthaltung der Zellsaftkonzentration, Verwendung von Glukose als Plasmolytikum) läßt sich die Zahl der wichtigen plasmolysezeitverändernden Faktoren auf folgende vier reduzieren:

1. Wandhaftung,
2. Viskosität,
3. Plasmaspannung,
4. Plasmadicke.

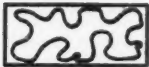

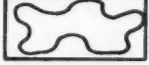





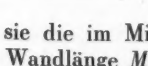
Es soll nun der Versuch gemacht werden, von diesem Faktorenkomplex einen weiteren Faktor: die Wandhaftung, abzutrennen, um der Bestimmung der Viskosität (bzw. auch der Plasmaspannung) mittels der *PZ* näherzukommen. Dieser Versuch mag als Anregung dienen, die Plasmolyseform- und -zeitmethode Webers quantitativ stärker zu präzisieren.

3. Beziehungen zwischen Plasmolyseform und Plasmolysezeit (Abrundungskoeffizient)

Die folgende Untersuchung geht von der Überlegung aus, daß eine durch stärkere Adhäsion des Plasmas erzeugte konkave *PF* selbstverständlich eine längere Zeit bis zur Erreichung der konvexen Form benötigt, als eine von vornherein gegebene stärker konvexe *PF*, daß folglich eine hohe *PZ* nicht unbedingt als Maß einer hohen Viskosität zu deuten ist, sondern genau so gut als Maß einer starken Wandhaftung des Plasmas. Der Einfluß dieser Wandhaftung kann nur eliminiert werden, wenn man den Abrundungsverlauf nach vollständiger Ablösung des Plasmas von der Wand verfolgt, und zwar geschieht dies durch eine zahlenmäßige Verknüpfung von Plasmolyseform und Abrundungszeit des frei beweglichen Protoplasten. Der erste Schritt hierzu besteht nun in der zahlenmäßigen Erfassung der *PF*. Da eine direkte Messung der Plasmaoberfläche nicht

möglich ist, muß es bei einer Abschätzung bleiben; das Einführen von Zahlenwerten für die PF bedeutet somit nicht das Ausschließen des subjektiven Fehlers, sondern nur das Übersetzen der subjektiv erfaßten Form in eine entsprechende Zahl. Schon Chododny und Sankewitsch (1934) unternahmen, wie bereits erwähnt, einen ähnlichen Versuch, indem

Tab. 1. *Quantitative Abschätzung der Plasmolyseform als Oberflächenverhältnis r . O bedeutet die vorliegende Oberfläche, O_{\min} die für das betreffende Volumen mögliche Minimaloberfläche (konvexe Form). Die beiden Spalten rechts dienen zur Berechnung des Fehlers von α (s. Gl. 5).*

PF	Bezeichnung	$r = \frac{O}{O_{\min}}$	$\ln r$	$\Delta(\ln r)$	$(\Delta \ln r \cdot 100)^2$
	Krampf	3—4 M = 3,5	1,10—1,39 M = 1,25	$\pm 0,15$	225
	extrem konkav 2	2—3 M = 2,5	0,69—1,10 M = 0,92	$\pm 0,23$	529
	extrem konkav 1	1,6—2 M = 1,8	0,47—0,69 M = 0,59	$\pm 0,12$	144
	stark konkav	1,5—1,6 M = 1,55	0,41—0,47 M = 0,44	$\pm 0,03$	9
	konkav	1,4—1,5 M = 1,45	0,34—0,41 M = 0,37	$\pm 0,03$	9
	schwach konkav	1,3—1,4 M = 1,35	0,26—0,34 M = 0,30	$\pm 0,04$	16
	eckig	1,2—1,3 M = 1,25	0,18—0,26 M = 0,22	$\pm 0,04$	16
	unregelmäßig konvex	1,1—1,2 M = 1,15	0,10—0,18 M = 0,14	$\pm 0,04$	16
	konvex	1,0—1,05 M ~ 1	0,0—0,05 M ~ 0	$\pm 0,05$	25

sie die im Mikroskop festgehaltene Plasmakontur P zur entsprechenden Wandlänge M in Beziehung setzten und das Verhältnis P/M als Maß für die PF benutzten. Mit Hilfe dieser Größe vermochten sie die Wirkung verschiedener Ionen auf die PF anschaulich zu demonstrieren. Das einfache Modellbeispiel einer Kugel in einem Würfel zeigt aber schon, daß dieses aus dem zweidimensionalen, mikroskopischen Querschnitt abgeleitete Zahlenverhältnis P/M keinen Aufschluß über die wirklichen Oberflächenverhältnisse bei der Plasmolyse gibt, auf die allein es ja bei der

quantitativen Auswertung der Plasmolyseform ankommt. P/M der Kugel beträgt im Querschnitt $\pi/4$, im Raum aber $\pi/6$. Dieser Unterschied läßt sich ebenfalls für beliebige andere Körper nachweisen, so daß der von Cholodny und Sankewitsch eingeschlagene Weg zu keinem letztlich fruchtbaren Ergebnis führt. In Tab. 1 ist nun das Resultat von Berechnungen zusammengestellt, die die Oberfläche verschiedener regelmäßiger Plasmolyseformen zahlenmäßig ausdrücken sollen. Hierzu wurden die Längenmaße der zweiten subepidermalen Zellschicht der Wurzel von *Lemna minor* verwertet, da diese aus gut zu berechnenden Zellen besteht $r = \frac{O}{O_{\min}}$ und außerdem bei unseren Versuchen allein zur Messung der PZ und PF herangezogen wurde. Für die Rechnung wurden die stereometrischen Formeln von Prisma, Würfel, Kugel und Kugelskalotte benutzt und die hiermit nicht erfassbaren Oberflächenformen überschlagsweise auf die einfachen Modelle zurückgeführt. Die in Tab. 1 angegebenen r -Werte bedeuten das Verhältnis der durch die Plasmolyse erzeugten Oberfläche O zu der für das betreffende Volumen möglichen Minimaloberfläche O_{\min} (konvexe Form), also $r = O/O_{\min}$; ferner ist der natürliche Logarithmus dieser Werte angegeben, welcher in die weitere Berechnung eingeht. Die Tabelle gilt für alle kubischen und prismatischen Zellen beliebiger Pflanzen.

Der quantitative Zusammenhang zwischen dem Oberflächenverhältnis r und der Zeit hat theoretisch den Charakter einer Exponentialfunktion, wenn man den frei beweglichen Protoplasten als einfaches physikalisches System betrachtet. Abb. 1 zeigt, daß bei *Lemna* der wirkliche Abrundungsverlauf dem theoretischen tatsächlich mit großer Annäherung entspricht. Es wird daher in den folgenden Ausführungen der Abrundungsvorgang bei der Plasmolyse durch eine exponentielle Näherungsformel wiedergegeben, in der die Oberfläche O (bzw. r) als Funktion der Zeit t auftritt, wobei t die nach Einlegung in das Plasmolytikum verstreichende Zeit darstellt:

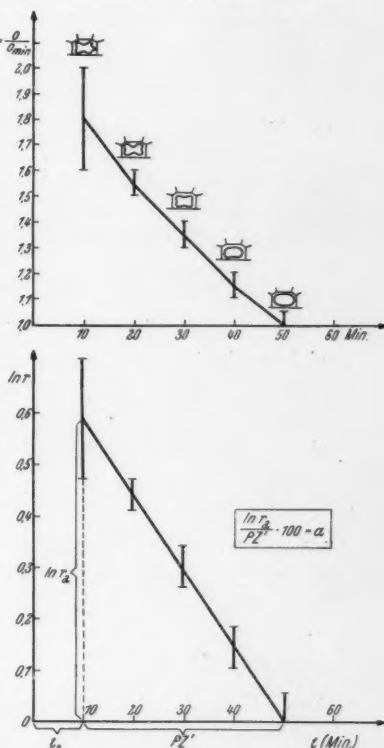


Abb. 1. Veränderung des Oberflächenverhältnisses r und seines natürlichen Logarithmus mit der Zeit. Nachweis, daß der wirkliche Plasmolyseverlauf nach Ablösung des Plasmas von der Wand theoretisch einer Exponentialfunktion nahekommt. Die Werte der logarithmischen Darstellung (unten) bilden mit größerer Annäherung eine Gerade als die Werte der linearen Darstellung (oben).

$$O = O_{\min} \cdot e^{\frac{\alpha}{100}(PZ-t)} \quad (1)$$

Die Näherungsformel gilt in dem Bereich $O < t < PZ$ und verliert darüber hinaus ihren Sinn. α kann als „Abrundungskoeffizient“ bezeichnet werden. Er ist in unserem Falle nur von der Plasmaspannung, der Viskosität und der Plasmadicke abhängig, und zwar wird er größer (die Abrundung schneller) bei wachsender Spannung, kleiner (die Abrundung langsamer) bei wachsender Viskosität und Dicke, was man zur Veranschaulichung etwa folgendermaßen ausdrücken kann:

$$\alpha = f \left(\frac{\text{Plasmaspannung}}{\text{Viskosität} \cdot \text{Plasmadicke}} \right) \quad (2)$$

Der Abrundungskoeffizient α ist also ein relatives Maß für das Zusammenwirken von Plasmaspannung, Viskosität und Plasmadicke. Um Aufschluß über das Verhalten der drei Größen im einzelnen zu gewinnen, muß er zunächst zahlenmäßig bestimmt werden können. Man schreibt zu dem Zwecke Gleichung (1) in der Form

$$r = \frac{O}{O_{\min}} = e^{\frac{\alpha}{100}(PZ-t)}$$

und logarithmiert sie zur Basis e , so daß man erhält

$$\ln r = \frac{\alpha}{100}(PZ-t)$$

und

$$\alpha = \frac{\ln r \cdot 100}{PZ - t} \quad (3)$$

Zu dem Zeitpunkt t_a , in dem sich gerade das gesamte Plasma von der Wand abgelöst hat, betrage das Oberflächenverhältnis $r = r_a$. Dann ist unter Einsetzen von $PZ - t_a = PZ'$

$$\alpha = \frac{\ln r_a \cdot 100}{PZ'} \quad (\text{s. Abb. 1}). \quad (4)$$

Dieses ist nun die endgültige Bestimmungsformel für α . Sie ermöglicht eine Berechnung des gesuchten Koeffizienten aus den Größen r_a und PZ' , welche sich aus Plasmolyseform und Plasmolysezeit leicht in der angegebenen Weise ableiten lassen. Der mittlere quadratische Fehler von α beträgt nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz

$$(\Delta\alpha)_m = \pm \frac{1}{PZ'} \cdot \sqrt{(100 \cdot \Delta \ln r_a)^2 + \alpha^2 \cdot (\Delta PZ')^2} \quad (5)$$

¹ Daß im Exponenten als Koeffizient der Zeit nicht α , sondern $\alpha/100$ eingesetzt wurde, hat rein praktische Gründe. Es werden dadurch zu lange Dezimalbrüche für α vermieden.

² Das unbestimmte Funktionszeichen f soll ausdrücken, daß keinesfalls lineare Proportionalität zu bestehen braucht.

In dieser Fehlerformel bedeutet $\Delta \ln r_a$ den mittleren absoluten Fehler von $\ln r_a$, welcher aus Tab. 1 zu entnehmen ist, und $\Delta PZ'$ den mittleren quadratischen Fehler von PZ' , der sich aus den Fehlern von PZ und t_a durch die Formel

$$(\Delta PZ')^2 = (\Delta PZ)^2 + (\Delta t_a)^2$$

ergibt.

Der Abrundungskoeffizient a ist eine von der Wandhaftung unabhängige, charakteristische Größe des Zytoplasmas. Er stellt bei Berücksichtigung von Plasmaspannung und Plasmadicke und nach Durchführung einer Fehlerrechnung trotz der großen Ungenauigkeit der PF -Abschätzung ein exakteres und biologisch einwandfreieres Viskositätsmaß dar als die Plasmolysezeit.

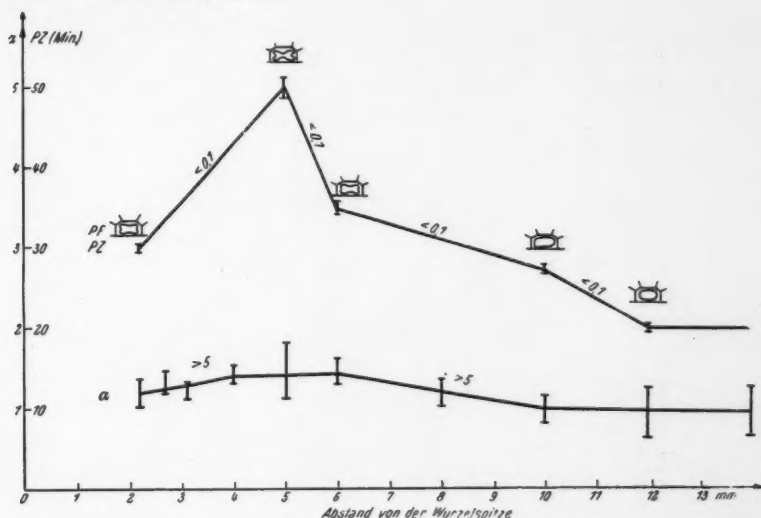


Abb. 2. Der Gradient der PZ und PF in der *Lemna*-Wurzel (Kulturalter 18 Tage) und die zugehörigen α -Werte. Nachweis, daß der Plasmolysezeitgradient vornehmlich eine Wirkung der Wandhaftung des Plasmas und keine einfache Viskositätswirkung darstellt. Die Streubereiche geben die mittleren quadratischen Fehler, die Zahlen zwischen den Werten die p -Werte der statistischen Sicherung an (vgl. Kuckuck und Mudra 1950). Der schwache Gradient der α -Werte ist statistisch nicht gesichert ($p > 5\%$) und daher bislang ohne allgemeine Bedeutung. Er würde zudem eher auf eine Erniedrigung der Viskosität in der Streckungszone hindeuten als auf eine Erhöhung (s. Glchg. 2).

4. Praktische Beispiele

Im folgenden sollen nun an Hand von drei Beispielen Verlauf und praktische Bedeutung einer α -Bestimmung gezeigt werden.

1. Wie Pirson und Seidel (1950) näher untersucht haben, zeigt die PZ in der *Lemna*-Wurzel einen Gradienten, der am Ende der Streckungs-

Tab. 2 a. *PF, PZ und α verschieden alter Kulturen von Lemna*
 Gradienten wie die *PF* und *PZ*. Die α -Differenz zwischen α
 schwach gesichert (p -Wert durchschnittlich
 Kultur da

Millimeter hinter Spitze	2,2	2,7	3,1
<i>PF</i>	schwach konkav	konkav	stark konkav
<i>PZ</i> (Min.) t_a	30 5	32,5 5	37,5 5
$\ln r_a$	0,30	0,37	0,41
<i>PZ'</i> (Min.)	25	27,5	32,5
$\alpha = \frac{\ln r_a}{PZ} \cdot 100 \text{ (Min.}^{-1}\text{)}$	1,20	1,34	1,26
$(\Delta\alpha)_m \text{ (Min.}^{-1}\text{)}$	$\pm 0,17$	$\pm 0,13$	$\pm 0,10$

Wurzeln. a bildet innerhalb der Wurzeln keinen gesicherten
 en den verschiedenen Kulturaltern (Tab. 2a und 2b) ist statistisch
 ittlich 3%, vgl. Kuckuck und Mudra 1950).

rdauer 18 Tage

	4	5	6	8	10	12-14
stärker konkav	stärker konkav	extrem konkav 1	stark konkav	schwach konkav	stark unregelm. konvex	schwach unregelm. konvex
5	42,5 10	50 10	35 5	30 5	27,5 5	20 5
1	0,47	0,59	0,44	0,30	0,22	0,14
5	32,5	40	30	25	22,5	15
6	1,44	1,47	1,47	1,20	0,99	0,93
10	± 0,11	± 0,35	± 0,17	± 0,17	± 0,18	± 0,32

Tab. 2 b. *PF, PZ und α verschiedener Kulturd*

Millimeter hinter Spitze	2,2	2,7	3,1
<i>PF</i>	unregelm. konvex	eckig	schwach konkav
<i>PZ</i> (Min.) t_a	10 5	15 5	20 10
$\ln r_a$	0,14	0,22	0,30
<i>PZ</i> (Min.)	5	10	10
$\alpha = \frac{\ln r_a}{PZ} \cdot 100 \text{ (Min.}^{-1}\text{)}$	2,80	2,20	3,00
$(\Delta\alpha)_m \text{ (Min.}^{-1}\text{)}$	$\pm 0,89$	$\pm 0,43$	$\pm 0,58$

verschieden alter Kulturen (vgl. Tab. 2 a).
 erdauer 31 Tage

1	4	5	6	8	10	12-14
schwach konkav	konkav	schwach konkav	schwach konkav	unregelm. konvex	konvex	konvex
0 0	27,5 15	20 10	15 5	10 5	5 5	5 5
30	0,37	0,30	0,30	0,14	0	0
0	12,5	10	10	5	0	0
00	2,95	3,00	3,00	2,80	unbest.	unbest.
0,58	$\pm 0,44$	$\pm 0,58$	$\pm 0,45$	$\pm 0,89$	—	—

Ein Versuch zur quantitativen Auswertung der Plasmolyseform- und -zeichmethode 431

zone ein Maximum hat und sowohl zur Spitze als auch zur Basis der Wurzel hin abfällt. Zur Prüfung der Frage, ob dieser Gradient tatsächlich, wie gewöhnlich angenommen, ein Viskositätsgradient ist, wurden je acht junge Wurzeln (Kulturdauer 18 Tage) und zum Vergleich acht alte Wurzeln (Kulturdauer 31 Tage) auf ihre α -Werte hin untersucht. Das Ergebnis ist in Tab. 2 und Abb. 2 dargestellt. Es ist daraus zu ersehen, daß der PZ-Gradient der *Lemna*-Wurzel in den α -Werten nicht in Erscheinung tritt und daher kein einfacher Viskositätsgradient sein kann, sondern vornehmlich eine Wirkung unterschiedlicher Wandhaftung darstellt. Es liegt nahe, daß in den Zonen starken Membranwachstums ein besonders inniger Kontakt des Plasmas mit der Wand besteht, der ein Loslösen bei der Plasmolyse erschwert (vgl. Bünning 1948)³. — In alten Wurzeln ist der durchschnittliche α -Wert größer (die Abrundung schneller) als in jüngeren Wurzeln, was durch eine Abnahme der Viskosität, aber auch schon allein durch die Abnahme der Plasmadicke erklärt werden kann. Dieser Versuch zeigt, wie vorsichtig man bei der Deutung der PZ als „Viskositäts“maß vorgehen muß und wie aufschlußreich eine α -Berechnung sein kann. Daß

Tab. 3. Wirkung von Isopropylalkohol auf den Abrundungskoeffizienten α . Einwirkungsdauer 15 Min., Konzentration 4%, Plasmolyse in 0,4 mol Glukose. Differenz gut gesichert.

	Normal	Alkoholbehandlung
PF	konkav	konkav
PZ (Min.)	47,5	25
t_a	5	5
$\ln r_a$	0,37	0,37
PZ' (Min.)	42,5	20
α (Min. ⁻¹)	0,87	1,85
$(\Delta\alpha)_m$ (Min. ⁻¹)	$\pm 0,08$	$\pm 0,24$
p-Wert	0,12%	

lyse erschwert (vgl. Bünning 1948)³. — In alten Wurzeln ist der durchschnittliche α -Wert größer (die Abrundung schneller) als in jüngeren Wurzeln, was durch eine Abnahme der Viskosität, aber auch schon allein durch die Abnahme der Plasmadicke erklärt werden kann. Dieser Versuch zeigt, wie vorsichtig man bei der Deutung der PZ als „Viskositäts“maß vorgehen muß und wie aufschlußreich eine α -Berechnung sein kann. Daß

³ Bei Objekten mit größerer Plasmadicke scheint bei der Plasmolyse allerdings häufig ein Abreißen der äußeren Plasmaschicht vom übrigen Plasma einzutreten (vgl. Strugger 1949), so daß in solchen Fällen die Wandhaftung eine untergeordnete Rolle bei der Plasmolyse spielt und der Ablösungsvorgang von der Viskosität des Ektoplasmas bestimmt wird. Aber auch in solchen Fällen erübrigt sich eine α -Bestimmung keinesfalls, da man im allgemeinen nicht nur die Viskosität des Ektoplasmas, sondern die des gesamten Plasmas untersucht.

in wachsenden Zellen die Viskosität nicht unbedingt erhöht und in Dauerszellen erniedrigt sein muß, zeigten schon Untersuchungen von Borris (1938), Ruge (1940) und Virgin (1951) mit der Plasmolyse- bzw. Zentrifugen-Methode an *Helodea*.

2. Durch kurzzeitige Einwirkung von Isopropylalkohol auf *Lemna*-Wurzeln (10 Wurzeln wurden 15 Minuten lang in 4%igem Isopropylalkohol gehalten und dann in 0,4 mol Glukoselösung plasmolysiert) wurde eine Zunahme der α -Werte bewirkt (Tab. 3). Eine Erhöhung der Plasmaspannung bei Anwendung des grenzflächenaktiven Alkohols ist zwar möglich, jedoch unwahrscheinlich (vgl. Czapek 1911 und Diskussion bei Netter 1951). Da zudem die Dicke der Plasmanschicht sich in der kurzen Zeit des Versuches nicht wesentlich ändern konnte, so ist die Verdoppelung des

Tab. 4. Veränderung des Abrundungskoeffizienten α bei 16stündiger anaerober Atmung in Stickstoffatmosphäre. Differenz schwach gesichert.

	Normalatmosphäre bzw. O ₂ -Atmosphäre	N ₂ -Atmosphäre
PF	eckig	eckig
PZ (Min.)	30	55
t_a "	5	5
$\ln r_a$	0,22	0,22
PZ' (Min.)	25	50
α (Min. ⁻¹)	0,88	0,44
$(\Delta\alpha)_m$ (Min. ⁻¹)	$\pm 0,18$	$\pm 0,11$
p-Wert	5%	

Abrundungskoeffizienten α in diesem Falle wohl eher auf eine Erniedrigung der Viskosität zurückzuführen. Diese Deutung deckt sich mit Ergebnissen von Heilbronn (1914), el Derry (1930), Northen (1938), Carrier (1949) u. a. an narkotisierten Pflanzen.

3. Es wurden Plasmolyseform und -zeit von je 10 Pflanzen aus einer O₂-Atmosphäre und von 10 Pflanzen aus einer reinen N₂-Atmosphäre nach 16stündiger Verdunkelung vermessen und die zugehörigen α -Werte berechnet. Das Ergebnis ist in Tab. 4 dargestellt. Ob das bei anaerober Atmung vorgefundene Absinken von α auf die Hälfte des bei aerober Atmung erhaltenen Wertes durch eine Veränderung der Plasmaspannung, der Viskosität, oder durch beide zugleich hervorgerufen ist, kann nicht sicher entschieden werden. Ein wesentlicher Unterschied der Plasmadicke war optisch nicht festzustellen, kommt also wohl nicht als Ursache der Veränderung in

Betracht. Frühere Versuche ergaben (Schaefer 1954), daß nach 24stündiger anaerober Atmung in Stickstoffatmosphäre klebrige, Fäden ziehende Protoplasten auftreten, die Krampfplasmolyse zeigen, — Erscheinungen, die auf eine erhöhte Viskosität schließen lassen. Es ist somit wahrscheinlich, daß die hier bei unterdrückter Atmung gefundene Erniedrigung von α auf einer Erhöhung der Viskosität beruht (vgl. auch Seifriz 1950).

Es sei ausdrücklich betont, daß in den obigen Versuchen die Grundvoraussetzung einer α -Bestimmung erfüllt war: die Protoplasten hatten sich nach der Zeit t_a durchschnittlich von sämtlichen Zellwänden gelöst. Das Verfahren versagt in allen Fällen, wo eine Lösung des Plasmas von der Wand unterbleibt oder zu spät erfolgt, jedoch lassen sich solche Fälle oft durch Anwendung stärker hypertotonischer Plasmolytika ausschalten.

Als Faustregel für eine α -Probe sei abschließend bemerkt, daß nach den bisher gemachten Erfahrungen eine Veränderung von α auf mehr als das Doppelte oder die Hälfte als statistisch gesicherter Unterschied zu werten ist, sofern mindestens acht Zellen vermessen wurden. Derartige Unterschiede sind allgemein größer als der zweifache mittlere Fehler von α , der durch die Ungenauigkeit der PF-Abschätzung und PZ-Messung und durch die biologische Streuung seitens des Objektes entsteht.

Die zusätzliche Durchführung einer α -Bestimmung zu den anderen Methoden der Viskositätsmessung dürfte die Aussagen über das Verhalten der plasmatischen Viskosität zukünftig noch besser fundieren. In den sicher nicht seltenen Fällen allerdings, in denen Plasmaspannung und Viskosität durch denselben stofflichen Faktor verändert werden, lassen sich ihre Auswirkungen auf den Abrundungskoeffizienten schwer trennen. In solchen Fällen wird die Plasmolyseform- und -zeitmethode so lange versagen, bis die Plasmaspannung unseren Messungen zugänglich wird. Vorläufig kann die Aufgabe dieser Methode nur darin bestehen, Aufschluß zu geben über die Wandhaftung des Plasmas (bzw. Viskosität des „Ektoplasmas“) einerseits und das Zusammenwirken von Viskosität, Spannung und Dicke des Plasmas andererseits. Eine Analyse des letztgenannten Komplexes gelingt gegenwärtig nur teilweise durch vorsichtiges Abschätzen der Plasmadicke und durch kritische Anwendung der Zentrifugiermethode zur Bestimmung der Viskosität. Eingehende Erfahrungen auf diesem Gebiet müssen erst noch gesammelt und sollen in einer späteren Veröffentlichung mitgeteilt werden.

5. Zusammenfassung

1. Die geschichtliche Entwicklung der Plasmolyseform- und -zeitmethode wird skizziert.
2. Mit Hilfe einfacher stereometrischer Modelle werden die häufigsten Typen der Plasmolyseform quantitativ erfaßt.
3. Die Zulässigkeit einer quantitativen Verknüpfung von Plasmolyseform und Plasmolysezeit in einer Exponentialfunktion wird experimentell geprüft.
4. Als neue charakteristische Größe für den Plasmazustand wird der „Abrundungskoeffizient“ α eingeführt.

5. Die Bedeutung dieses Koeffizienten sowie seine Abhängigkeit von Viskosität, Plasmaspannung und Plasmadicke werden an Hand dreier Beispiele demonstriert.

6. Es wird mit Hilfe der α -Bestimmung gezeigt, daß der Plasmolysezeit-Gradient der *Lemna*-Wurzel im wesentlichen ein Gradient der Wandhaftung und nicht der Viskosität ist, da er in den α -Werten nicht auftritt. Durch Behandlung mit Isopropylalkohol läßt sich der Koeffizient bei *Lemna* dagegen erhöhen, durch Hemmung der aeroben Atmung vermindern, was in diesen Fällen mit einer Änderung der Viskosität erklärt werden kann.

Herrn Prof. Dr. A. Pirson möchte ich an dieser Stelle für fruchtbare Anregungen danken. Die experimentellen Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft in dankenswerter Weise unterstützt.

Zitierte Literatur

- Barth, L. G., 1929: The Effects of Acids and Alkalies on the Viscosity of Protoplasm. *Protoplasma* 7, 505.
- Beck, W. A., 1927: Cane Sugar and Potassium Nitrate as Plasmolysing Agents. *Protoplasma* 1, 15.
- Bogen, H. J., und H. Prell, 1953: Messung nichtosmotischer Wasseraufnahme an plasmolysierten Protoplasten. *Planta* 41, 459.
- Borriß, H., 1958: Plasmolyseform und Streckungswachstum. *Jb. wiss. Bot.* 86, 784.
- Bünning, E., 1948: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin. 85.
- Cholodny, N., und E. Sankewitsch, 1934: Plasmolyseform und Ionenwirkung. *Protoplasma* 20, 57.
- Currier, H. B., 1949: Responses of Plant Cells to Herbicides. *Plant Physiol.* 24, No. 4, 601.
- Czapek, F., 1911: Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen. Jena.
- Derry, B. H. el, 1930: Plasmolyseform- und Plasmolysezeitstudien. *Protoplasma* 8, 1.
- Fischer, H., 1948: Plasmolyseform und Mineralsalzgehalt in alternden Blättern. I. Untersuchungen an *Helodea* und *Fontinalis*. *Planta* 35, 513.
- Guest, W. L., and W. C. M. Lewis, 1939: The effect of electrolytes upon the interfacial tension between water and dekalin (trans-decahydronaphtale). *Proc. roy. Soc. A* 170, 501.
- Heilbronn, A. L., 1914: Zustand des Plasmas und Reizbarkeit. *Jb. wiss. Bot.* 54, 357.
- Kuckuck, H., und A. Mudra, 1950: Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenzüchtung. Stuttgart.
- Langmuir, I., 1939: Pilgrim Trust Lecture. Molecular layers. *Proc. roy. Soc. A* 170, 1.
- Missbach, G., 1927: Versuche zur Prüfung der Plasmaviskosität. *Protoplasma* 3, 327.
- Netter, H., 1951: Biologische Physikochemie. Potsdam.

- Northern, H. T., 1938: Protoplasmic Structure in *Spirogyra*. III. Effects of Anesthetics on Protoplasmic Elasticity. Bot. Gaz. 100, 238.
- Pirson, A., und F. Seidel, 1950: Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. Planta 38, 449.
- Ruge, U., 1940: Kritische zell- und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Blattzähnen von *Helodea densa*. Flora 134, 311.
- Schaefer, G., 1954: Diss. Marburg.
- Schmidt, H., K. Diwald und O. Stocker, 1940: Plasmatische Untersuchungen an dürrerepfindlichen und dürreresistenten Sorten landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Planta 31, 559.
- Seifriz, W., 1923: Observations on the Reaction of Protoplasm to some Reagents. Ann. Bot. 147, 505.
- 1950: The Effects of Various Anesthetic Agents on Protoplasm. Anesthesiology 11, 24.
- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin.
- Timmel, H., 1927: Zentrifugen-Versuche über die Wirkung chemischer Agentien, insbesondere des Kaliums auf die Viskosität des Protoplasmas. Protoplasma 3, 197.
- Virgin, H. I., 1951: The effect of light on the protoplasmic viscosity. Physiol. Plantarum 4, 255.
- Weber, F., 1924: Plasmolyseform und Protoplasmaviskosität. Österr. bot. Z. 73, 261.
- 1929: Plasmolyse-Zeit-Methode. Protoplasma 5, 622.
- 1929: Zentrifugierung und Protoplasma-Viskosität. Protoplasma 7, 444.
- und H. Hohenegger, 1923: Reversible Viskositäts-erhöhung des Protoplasmas bei Kälte. Ber. dtsch. bot. Ges. 41, 198.

Die Leukoplasten von *Helleborus*

Von

Irmtraud Thaler

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 26. November 1954)

Bei den Dicotylen sind die Leukoplasten nur von sehr geringer Größe, meist bedeutend kleiner als die Chloroplasten. Verhältnismäßig große und daher leichter zu beobachtende Leukoplasten kannte man bisher nur bei den Commelinaceen, Liliaceen und einigen anderen Monocotylen. Es war daher überraschend, in der Blattepidermis von *Helleborus corsicus* große kugelförmige Gebilde zu finden, die sich bei näherer Untersuchung als Leukoplasten erwiesen (Thaler 1953). Eine Vorstellung von der Größe dieser Leukoplasten gibt ein Vergleich mit den Leukoplasten von *Tradescantia discolor*, die schon als besonders groß gelten. Unter der Annahme, daß die Leukoplasten kugelförmige Gestalt besitzen, haben die von *Tradescantia* ein Volumen von $4 \mu^3$, die von *Helleborus corsicus* aber ein Volumen von $600 \mu^3$ (Abb. 1 a und b). Diese großen Leukoplasten kommen bei *Helleborus corsicus* in allen Organen mit Ausnahme der Wurzel vor, aber nur in den Epidermiszellen und im chloroplastenfreien Blatthypodermis. Andere Arten der Gattung *Helleborus*, wie *Helleborus foetidus*, *Helleborus niger* und *Helleborus olympicus*, weisen auch in den Epidermiszellen der Blätter keine derartigen Riesenleukoplasten auf. Dagegen ergab die Untersuchung von *Helleborus*-Früchten, daß in der Epidermis der Kapselwand auch bei *Helleborus niger* und *Helleborus foetidus* diese großen Leukoplasten vorkommen. Was die Leukoplasten bei *Helleborus* besonders interessant macht, ist, daß sie in jungen, ungefähr 3 mm großen Blattanlagen mit Stärke erfüllt sind. Mit fortschreitender Entwicklung des Blattes wird die Stärke abgebaut und die Leukoplasten bilden dann Eiweiß (Härtel und Thaler 1953). Der besondere Eiweißreichtum kommt durch den positiven Ausfall der Eiweißreaktionen (Millon, Biuret, Xanthoprotein, Ninhydrin) zum Ausdruck. Diese Leukoplasten wurden daher als Proteino-plasten bezeichnet. Über das Verhalten dieser Plastiden gegenüber verschiedenen Reagenzien vergleiche Härtel und Thaler (1953). In intak-

ten Zellen in Wasser liegender Schnitte bleiben die Plastiden lange unverändert erhalten, in verletzten Zellen verschwinden sie momentan. Werden Blätter einige Tage unter Wasser bei 38° C gehalten, so verändern sich die Leukoplasten vollkommen. Sie haben eine intensive bräunliche Färbung angenommen, ebenso wie Leukoplasten in erfrorenen Zellen. Die so veränderten Leukoplasten lassen sich durch Zerreiben der Blattepidermis isolieren und bleiben dabei in Wasser wie auch in Säuren erhalten.

Eine Lebendfärbung der Leukoplasten gelang weder mit sauren Farbstoffen (Säurefuchsin, Eosin) noch mit basischen (Neutralrot, Toluidinblau und Pyronin); ebensowenig gelang eine Vitalfärbung mit Rhodamin B. Bei Behandlung mit dem sauren Fluorochrom Kaliumfluoreszein läßt sich bei pH 3,5 und pH 5 im Fluoreszenzmikroskop eine starke Gelbfluoreszenz der Leukoplasten erzielen.

Durch die Untersuchung von Strugger (1951) über das Vorkommen

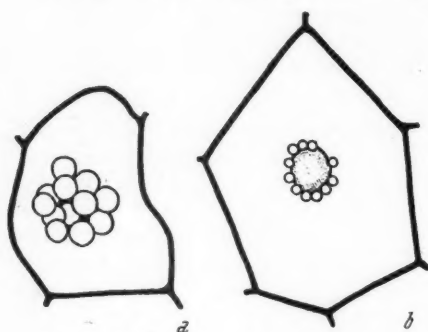


Abb. 1 a. *Helleborus corsicus*, Leukoplasten in der Blattepidermis.

Abb. 1 b. *Tradescantia virginica*, Leukoplasten in der Blattepidermis.

eines primären Granums in Proplastiden ist die Frage nach dem Vorkommen eines derartigen Körpers auch in Leukoplasten aktuell geworden. Perner (1954) hat für die Leukoplasten von *Allium Cepa* und *Tradescantia virginica* die Existenz eines primären Granums nachgewiesen, doch ist dieses Gebilde im Hellfeld wahrscheinlich infolge des geringen Lichtbrechungsunterschiedes nicht zu sehen, dagegen wohl im Phasenkontrastmikroskop und im Dunkelfeld. Nach eigenen Beobachtungen sind bei *Allium nutans* und *Chlorophytum comosum* die

Grana schon im Hellfeld leicht zu sehen, und zwar in den Leukoplasten der Epidermiszellen der Blütenblätter von *Allium* meist ein (vgl. Abb. 2 a), in denen von *Chlorophytum* ein bis drei Grana in jedem Leukoplasten.

Auch die Leukoplasten von *Helleborus corsicus* sind im Hellfeld keineswegs immer homogen; es ist in ihnen nicht selten ein rundes, farbloses Gebilde zu beobachten, bei manchen Pflanzen ist es in jedem Leukoplast der Epidermiszellen vorhanden, während es in der Epidermis der Blätter derselben Pflanze nur selten zu sehen ist. Infolge der starken Cuticularisierung konnte man im Phasenkontrastmikroskop allerdings keine weiteren Aufschlüsse über diesen Einschlufkörper erhalten. Die Identifizierung dieses Gebildes mit schon von anderen Autoren in Leukoplasten aufgefundenen Einschlüssen stößt jedoch auf Schwierigkeiten. Schon Meyer (1885) bildet Leukoplasten mit farblosen Einschlufkörpern in den Epidermiszellen von *Yucca filamentosa* ab und schreibt darüber: „Diese Anaplasten führen niemals Stärke; sie sind ganz homogen, enthalten aber meist einen Einschluf

von stärkerem Lichtbrechungsvermögen.“ Schimper (1885) hat in den Leukoplasten von *Goodyera pubescens* Einschlusskörper gesehen, dessen Natur er nicht feststellen konnte. Dann hat Zimmermann (1893) in den Leukoplasten einiger *Tradescantia*-Arten stärker lichtbrechende kugelige Körper beobachtet, er bezeichnet sie als Leukosomen. Ähnlich äußert sich Dangeard (1951) über die Einschlusskörper in den Leukoplasten von *Serapias lingua*, „les leucoplastes épidermiques renferment une inclusion peu visible, de nature inconnue...“ Dieser Einschluss ist jedenfalls weder Stärke noch Öl. Auch bei *Orchis latifolia* enthalten die Leukoplasten einen oder zwei große Einschlusskörper.

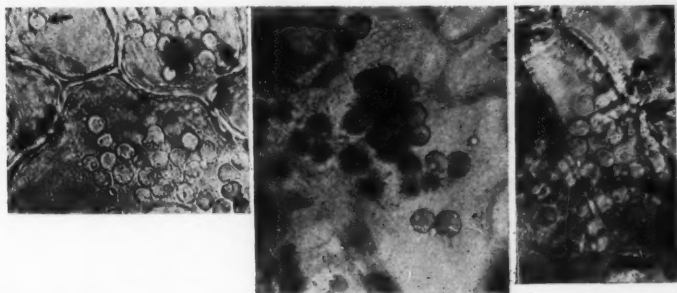


Abb. 2 a. *Helleborus corsicus*, Blattepidermis in verdünnter KOH-Lösung, Leukoplasten mit Grana.

Abb. 2 b. Ausstoßen des Einschlusskörpers durch Einwirkung von Jod-Jodkali.

Abb. 2 c. *Helleborus corsicus*, Stengelepidermis (lebend), in jedem Leukoplast ein Einschlusskörper.

Die in den Leukoplasten von *Helleborus* schon im Hellfeld leicht zu sehenden Gebilde wurden zunächst als Vakuolen aufgefaßt. Neue Beobachtungen sprechen aber gegen diese Deutung. In alternden Zellen wird der Einschlusskörper nicht selten aus den Leukoplasten ausgestoßen und bleibt, ohne seine kugelige Form zu verändern, im Cytoplasma erhalten, er macht dann den Eindruck eines festen Körpers. Durch Einwirkung von Jod-Jodkali oder Millonschem Reagens kann das Ausstoßen aus dem Stroma künstlich hervorgerufen werden (vgl. Abb. 2 b). Der Einschlusskörper kann seine Lage im Stroma verändern. Bartels (1953) beobachtete, daß in Schnitten, die in hypotonischen Lösungen liegen, die Grana innerhalb der Plastiden in Bewegung geraten, schließlich sprengen sie die Plastidengrenzschicht und gelangen so ins Plasma.

Auffallend ist, daß dieser Einschluss keineswegs immer zu sehen ist. Von welchen Änderungen der Leukoplasten dies abhängt, konnte nicht ermittelt werden. Vielleicht handelt es sich um eine Änderung der Lichtbrechungsunterschiede zwischen Leukoplastenstroma und Einschlusskörper. Längeres Verdunkeln brachte diese Gebilde nicht zum Verschwinden; beachtenswert ist es jedenfalls, daß dies Zimmermann (1893) auch für

die Leukosomen von *Tradescantia* angibt. Die Einschlusskörper der Leukoplasten von *Helleborus* sind mit dem Granum, das Perner (1954) für die Leukoplasten beschrieben hat und das wir bei *Chlorophytum comosum* und *Anthericum ramosum* gesehen haben, wohl nicht zu identifizieren:

Es werden in verdünnten KOH-Lösungen kleine Partikeln in den Leukoplasten sichtbar; diese Gebilde könnten mit den „optisch maskierten Grana“, die Bartels (1953) durch Quellung des Stromas in den Leukoplasten des somatischen Gewebes der *Vicia Faba*-Wurzel sichtbar gemacht hatte, verglichen werden (Abb. 2c).

Bei derartig auffallend großen Zellorganellen, wie es die Leukoplasten von *Helleborus* sind, drängt sich die Frage auf, ob ihnen eine besondere

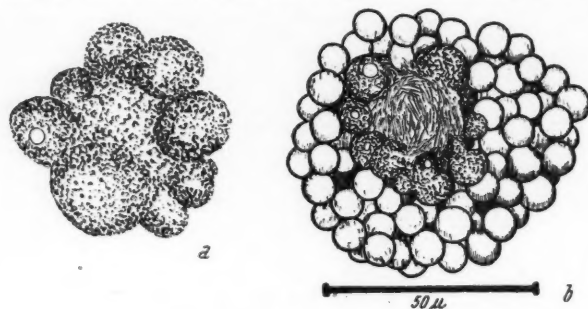


Abb. 3a. *Helleborus corsicus*, Lappenkerne in der Fruchtwandepidermis.
Abb. 3b. Teilkerne des Lappenkernes, umgeben von Leukoplasten, in der Mitte ein Aggregat von nadelförmigen Kristallen.

Funktion zukommt. Im Frühstadium ihrer Entwicklung besitzen sie, wie bereits erwähnt, die Fähigkeit, Stärke zu bilden. Nach dem Verschwinden der Stärke werden die Leukoplasten eiweißreich, sie erlangen also die Fähigkeit zur Eiweißsynthese. Ob dieses Eiweiß dauernd umgesetzt wird, läßt sich nicht feststellen; eine Abnahme der Intensität der Eiweißreaktion der Leukoplasten beim Vergilben der Blätter war jedenfalls nicht wahrzunehmen.

Nach der von Caspersson (1941) begründeten Ansicht geht die Bildung der Nukleinsäuren und damit der Nukleoproteide primär vom Zellkern (Chromatin und Nukleolus) aus. In Zellen, die eiweißreiche Zellorganellen enthalten, kann demnach eine gesteigerte Aktivität des Zellkernes vermutet werden. Stoffwechselaktive Zellkerne zeichnen sich durch besondere morphologische Eigenheiten, wie Lappenbildung und Oberflächenvergrößerung, aus. Die Zellkerne der Blattepidermis von *Helleborus corsicus* sind groß und enthalten einen oder mehrere voluminöse Nukleolen. Einen überraschenden Anblick bieten die Zellkerne der Epidermis der Fruchtwand. Sie sind mit vielen Lappen versehen und zerfallen nicht selten in einzelne Teilkerne, von denen manche Nukleolen besitzen, andere nicht (vgl. Abb. 3a). Diese Kerne gleichen in ihrem Aussehen ganz den noyaux geants, die Martin (1946) im Parenchym des Rhizoms von

Topinambur unter dem Einfluß von Colchizin und Naphthylelessigsäure erzielte. Martin faßt sie als die Folge wiederholter Stathmokinesen auf. Bemerkenswert ist es nun, daß die Kerne der Fruchtwandepidermis man-

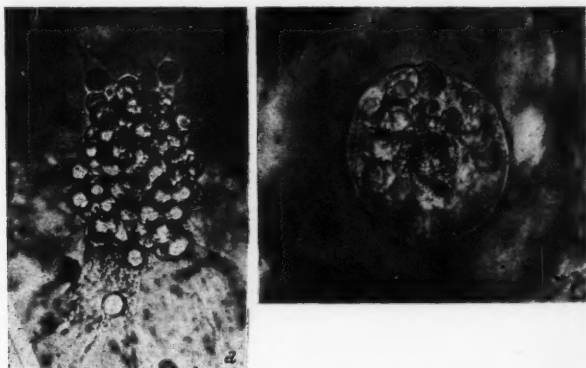


Abb. 4 a. *Helleborus corsicus*, ungeschädigte Zelle der Fruchtwandepidermis; Leukoplasten in Systrophe um den Kern.

Abb. 4 b. Geschädigte Zelle der Fruchtwandepidermis, Leukoplasten vereinigen sich zu einer einheitlichen Masse.

cher *Allium*-Arten ähnliche Riesenkerne besitzen (*Allium karataviense* und *Allium Ostrowskianum*). Bei diesen *Allium*-Arten enthält die Epidermis der Fruchtwand nun auch sehr große Leukoplasten, die an Größe denen von *Helleborus corsicus* kaum nachstehen. Es scheint also eine Relation zwischen der Größe (Polyploidiestufe?) des Zellkernes und der Größe der Leukoplasten und damit dem Eiweißreichtum der Zelle zu bestehen.

In diesem Zusammenhang ist noch auf einen weiteren sehr eigenartigen Inhaltskörper der Epidermiszellen

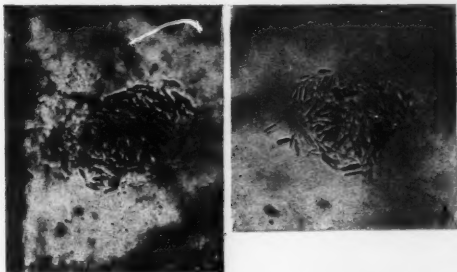


Abb. 5 a. *Helleborus corsicus*, Kristallnadeln in 96%igem Alkohol.

Abb. 5 b. Kristallnadeln in 3%iger Schwefelsäure.

der Fruchtwand von *Helleborus corsicus* hinzuweisen. Es sind dies kleine nadelförmige Kristalle, die in großer Zahl dicht geschart um den Kern liegen und ihn oft vollkommen einhüllen (vgl. Abb. 3 b). Diese Kristalle liegen im Cytoplasma und werden offenbar im Zuge des Zustandekommens der Plasma-Karyostrophe in breiten Cytoplasma-bändern und Strängen mit den Leukoplasten an den Kern herangeführt. Sobald die Kristall- und Leukoplasten-Systrophe perfekt ist, blei-

ben zwar die Cytoplasmastränge oft erhalten, scheinen aber vollkommen zu erstarren und zeigen keine Spur von Strömung mehr (Abb. 4a). Tritt eine Schädigung der Zelle ein, so vereinigen sich die Leukoplasten zu einer einheitlichen Masse um den Kern (Abb. 4b). Die chemische Natur dieser Kristalle konnte nicht eindeutig ermittelt werden, da wenig Früchte zur Verfügung standen und der Reifungsprozeß sehr rasch vor sich geht. Die Kristalle sind äußerst schwer löslich, sie bleiben in konzentrierter Salzsäure und Salpetersäure erhalten und widerstehen selbst konzentrierter Schwefelsäure (vgl. Abb. 5) sehr lange, ebenso konzentrierter Kalilauge, die Kristallnadeln, die negativ doppelbrechend sind, geben die Xanthoprotein- und die Millonreaktion, die wohl infolge der Kleinheit der Kristalle nur wenig intensiv sichtbar wird. Hinsichtlich ihrer schweren Löslichkeit und auch morphologisch erinnern sie an die Kristalle in der Epidermis der Zwiebel-Schuppenblätter von *Lilium candidum*; diese entstehen aus den Sterinoplasten und wurden von Mirande (1925) näher beschrieben.

Zusammenfassung

Die großen Proteinoplasten, die für die Epidermis des Laubblattes von *Helleborus corsicus* beschrieben wurden, konnten auch in der Fruchtwand-epidermis von *Helleborus foetidus*, *Helleborus niger* und *Helleborus olympicus* beobachtet werden. Der Einschlusskörper, der häufig in den Leukoplasten in Einzahl zu sehen ist, kann nicht mit einem Granum identifiziert werden; bei Quellung in KOH treten in den Leukoplasten von *Helleborus* ein oder zwei Partikel auf, die Ähnlichkeit mit dem Granum von *Allium Cepa* und *Vicia Faba* haben. In der Fruchtwandepidermis von *Helleborus corsicus*, *Allium karataviense* und *Allium Ostrorskianum* findet man in der Regel große Zellkerne mit Lappenbildung oder eine Anzahl von Teilkernen. In den Epidermiszellen der Frucht von *Helleborus corsicus* liegen im Cytoplasma um den Zellkern kleine, sehr schwer lösliche Kristallnadeln unbekannter Natur.

Literatur

- Bartels, 1953: Cytologische Studien an Leukoplasten unterirdischer Pflanzenorgane. Diss. Münster (noch unveröffentlicht).
 Caspersson, 1941: Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. Naturw. 29.
 Dangéard, 1951: Recherches sur la structure des chloroplastes et des leucoplastes. Le Botaniste 35.
 Härtel und Thaler, 1955: Die Proteinoplasten von *Helleborus corsicus* Willd. Protoplasma 42.
 Martin, 1946: Action de la Colchicine sur les Tissus de Topinambour cultivés « in vitro ». Rev. Cytologie et de Cytophysiologie végét. 8.
 Metzner, 1952: Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten. Biol. Zbl. 71.
 Meyer, 1885: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig.
 Mirande, 1925: Sur les organites élaborateurs particuliers (stérinoplastes) de l'épiderme des écailles de bulbes de Lis blanc. C. r. 167.

- Perner, 1954: Zum mikroskopischen Nachweis des „primären Granums“ in den Leukoplasten. Ber. dtsh. bot. Ges. 47.
- Schimper, 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. Jb. wiss. Bot. 16.
- Strugger, 1953: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsh. bot. Ges. 46.
- 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. Protoplasma 43.
- Thaler, 1953: Proteinoplasten fehlen den Schließzellen. Protoplasma 42.
- Zimmermann, 1893: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. 1. Tübingen.

Sammelreferat

The Reduction of Silver Nitrate by Plant Cells, Particularly by Chloroplasts

By

Susumu Nagai

The Institute of Polytechnics, Osaka City University, Ogimachi Kita-ku Osaka,
Japan

With 4 Text-figures

(Received June 24, 1954)

I. Introduction

The reduction of silver nitrate by plant cells, particularly by chloroplasts, has been studied as a remarkable phenomenon which is closely associated with the vital activity of the cell. Since the exploratory observation by Molisch (1918a), numerous works on this problem were performed in the field of cytology and cellular physiology. As the darkening due to reduced silver is specifically conspicuous only on the chloroplasts of intact cells, certain mechanisms other than simple reduction have been assumed by many investigators. The present review deals mainly with the works appeared during the recent fifteen years since the previous review by Weber (1937b), attempting to evaluate what they have contributed for elucidation of this phenomenon.

Darkening of the chloroplast due to reduced silver without notable coloration or precipitation elsewhere is named the "Molisch reaction." And the Molisch reaction in strict sense is called negative when the particular darkening of chloroplast does not occur. Reduction of silver reagent does not necessarily cause the Molisch reaction. According to cases, the whole cytoplasm and vacuole may become dark with diffusely scattered precipitate of silver, leaving the chloroplast not darkened. Conditions necessary for the darkening of chloroplast are chiefly considered in the following.

II. Conditions and mechanisms of the Molisch reaction

A. Ascorbic acid

Based on the strong reducing capacity of ascorbic acid (reduced form) the reduction was ascribed to this vitamin by many authors. This was a considerable progress in the knowledge on the nature of the reducing

agent effective in the Molisch reaction. Giroud and his school (1936, 1938) carried out extensive investigations on cells of plants as well as of animals. These French authors devised an acid silver reagent which was composed of 10 parts of silver nitrate, 1 part of glacial acetic acid and 100 parts of water, pH being about 4.0. The reagent was later called "Giroud's reagent" and was used widely. By the use of this reagent, various green tissues of plants showed the Molisch reaction conspicuously. It was stated that any other reducing substances than ascorbic acid could not reduce silver nitrate in such an acid solution. And the Molisch reaction was assumed to be due to the localization of ascorbic acid in chloroplasts. They also stated that ascorbic acid content was much higher in chlorophyllous tissues than in non-chlorophyllous ones. Giroud's reagent was frequently employed by later workers.

Dischendorfer (1937) also used Giroud's reagent for the treatment of the leaf of *Gladiolus* which contained surprisingly much ascorbic acid (above 300 mg.%). Conspicuous darkening of the granular structure which corresponded to grana was observed besides chloroplasts (Fig. 1)¹. Standing on this fact and others, he argued that grana were the centre for synthesis of ascorbic acid, which was derived from a certain photosynthetic product and then diffused across the boundary membranes into the vacuole. He also applied potassium permanganate and potassium ferricyanide and observed the reduction of these reagents in the vacuole, while the chloroplast showed no reduction. Ascorbic acid contained in the vacuole was, therefore, regarded to have nothing to do with the Molisch reaction. On the other hand, somewhat contradictory observation was made by Pekarek (1938) who also applied Giroud's reagent to *Gladiolus*. The green grana which had been distinctive before the treatment appeared as tiny blank spots stippled on the darkened background (stroma) which had previously been colourless (Figs. 2, 3). So he assumed that the reduction took place at the boundary of the grana and stroma.

It had been well-established that cells which have previously been killed or injured no longer exhibit the Molisch reaction. If the reduction would have been ascribed exclusively to ascorbic acid, the failure of the Molisch reaction might have meant rapid degradation or oxidation of ascorbic acid in a moment of killing of the cell. Weier (1938) examined the Molisch reaction in leaves of clover, sorrel, oxalis and several other materials by means of various methods of killing prior to application of the silver reagent (neutral 2 per cent solution). He could observe the reduction even in the previously killed materials provided that these were killed under the conditions which prevented oxidation, viz. in hydrogen gas or in vacuum. This American author concluded that the substance responsible for reduction was ascorbic acid which could retain its reducing capacity only in close association with the living chloroplast.

It is recalled here that Czapek (1920) discussed against Molisch (1918 a) on the mechanism of the localized darkening. Czapek observed the reduction of silver reagent in one of the fractions extracted by the usual chemical procedure from the leaf of *Aucuba japonica*. He argued

¹ Instead of reproducing the original figures, their numbers in the original papers printed in this journal are denoted in italics.

that the reduction could be caused even by the killed cell or cell extract in which some reducing substance, probably tannins, was present and also that the localized deposition of reduced silver might be conditioned by some mechanisms which were not necessarily characteristic of the living cells. Molisch (1921) again emphasized the vital specificity of the Molisch reaction by repeating experiments to justify his former observations. According to the present knowledge, ascorbic acid might have been present in the extract examined by Czapek.

B. Light and chlorophyll

It was elucidated earlier by Gautheret (1934) that light played an indispensable role in the occurrence of the Molisch reaction. Effectiveness of light of various wave lengths seemed to depend on the absorption efficiency by chlorophyll, and the occurrence of the Molisch reaction was always accompanied by the greening of plastids in the tissue which had been non-chlorophyllous at the beginning. According to this French author who stressed the importance of photosensitization in inducing the Molisch reaction, even such substances as oxyflavons and tannins that primarily had only weak reducing capacity became capable of the reduction when they were activated by the photosensitized chlorophyll.

While most of the authors who ascribed the reduction solely to ascorbic acid were apt to overlook the significance of photosensitization, Mirimannoff conducted unique studies with considerations critical against the significance of ascorbic acid. Quantitatively determined (1938 a, c, d), the ascorbic acid content did not change in parallel with the chlorophyll content. Several plant materials, e.g. *Narcissus* and *Tulipa*, contained much larger amount of ascorbic acid in non-chlorophyllous floral portions than in their green leaves. In the cytochemical investigation (1938 a) comparing the reaction by Giroud's reagent with those by Fehling's and Bezssonof's reagents, ascorbic acid was detected mainly in the vacuole. According to his conclusion, Giroud's reagent was not sufficiently specific to ascorbic acid in the cytochemical use. He performed a model experiment (1938 e) using glucose and glycine for the reducing agent and succeeded to reduce silver reagent on the surface of the fine grain of pumice stone artificially coated with chlorophyll. The reduction occurred, not in the dark, but only in the light. The non-coated pumice stone could not cause the reduction either in the light or in the dark. The significance of chlorophyll as the photosensitizer was thus emphasized against the current opinion in favour of ascorbic acid as the sole cause. Assuming that the chloroplast was maintained highly photosensitive only in the living cell, he also examined the reduction of silver reagent in the cells which were just killed in a condition preventing oxidation (1939). Contrasted to Weier's results (1938, *loc. cit.*), the Molisch reaction in the strict sense no longer occurred in any of the materials used, but non-localized reduction (diffuse precipitation of silver) was observed.

In fact, the Molisch reaction is too complicated to be explained simply by reduction by ascorbic acid or by hypothetical reducing power generated through photochemical activation of chlorophyll. The photosensitization must also be a key motive of the Molisch reaction as repeatedly emphasized by those authors who stressed essential role of light and chlorophyll.

C. Physiological conditions and other physical factors

Weber (1937 b) reviewed the extensive literature with fair probity. Though he did not express any decisive opinion on the mechanism of the Molisch reaction, later studies conducted by this Austrian author and his school seemed to be skeptic on the view of simple reduction caused exclusively by ascorbic acid. Among them, Hamdallah (1939) found that the Molisch reaction was entirely negative in the plants which were made chlorotic by iron or magnesium deficiency, in spite of that they contained no less ascorbic acid than the normal green ones. Neubauer (1939) confirmed that the ascorbic acid content correlated with the species of the plant and the growth activity of cell rather than the chlorophyll and carotenoid content. Considerably high ascorbic acid content was frequently found in some white flowers. It was noticed earlier by Linsbauer (1926) that the pattern of silver reduction in guard cells of stomata of *Chrysanthemum* were quite different according to the open and closed states. Höfler (1939), re-examining this relation under well-controlled experimental conditions, observed that the guard cells of stomata of *Vicia faba*, fully open in CO₂-free air, showed the over-all darkening of the protoplast together with the vacuole (Protoplastenschwärzung), while the typical Molisch reaction (Chloroplastenschwärzung) took place in the closed state (Figs. 2, 3). This author doubted the identity of reducing agent involved in the reactions in the open and the closed conditions. Ertl (1939) observed the silver reduction by the dark-grown cotyledon of a conifer, *Picea excelsa*, which was already green even in the dark. The Molisch reaction occurred almost immediately when the cotyledon of this conifer was illuminated, whereas other plant materials which had been etiolated in the dark and began to green in the light became capable of the Molisch reaction after a much longer period in the light. This author assumed that the agent of reduction was a certain photosynthetic product related to glucose. The green conifer cotyledons which were ready to begin photosynthesis could exhibit the Molisch reaction immediately after exposure to light, while the etiolated plants were not able to photosynthesize until chlorophyll was formed in the light. Furlinger (1938) noticed that plasmolysis prevented greening of etiolated cotyledons of sunflower and flax even when they were kept illuminated. The Molisch reaction could not appear in these plasmolysed cotyledons, whereas the reaction turned positive as soon as unplasmolysed and deplasmolysed etiolated cotyledons became green by the illumination. These investigations re-established that chlorophyll and light were essential factors in the Molisch reaction.

Studies by Caruso (1938 a, b, c, d, e) and Savelli and Caruso (1939 a, b) were carried out using Giroud's silver reagent. Diffusely precipitated silver in vacuole was often observed beside the darkened chloroplasts. These Italian authors assumed that the photosensitized reduction by the chloroplast and other reducing agent (ascorbic acid) could act on the silver reagent at the same time but in different ways according to physiological conditions of the cell. The typical Molisch reaction might be a particular case in which the photosensitized reduction was predominant. In regard to ascorbic acid, Weber (1938) and Mirimanoff (1938 b) observed the reduction of silver reagent by the secrete from ten-

tacles of *Drosera*. The secrete could reduce silver reagent in the light when spotted on filter paper.

Lepeschkin (1934 a, b) noticed the reduction of silver nitrate by yeast cells and erythrocytes when they were treated with silver reagent in the dark. He ascribed the reduction to the short-waved "nekrobiotische Strahlen" which were, according to his argument, emitted by the dying protoplasm. He assumed that the Molisch reaction of the chloroplast was also due to this radiation. This discussion was made in support for his "Vitaidetheorie" on the structure of protoplasm. As the chloroplast is greatly different in physiological properties from the materials he examined, it is yet uncertain whether the chloroplast alone among the cellular components would emit such necrobiotic radiations. But it should be borne in mind that the Molisch reaction proceeds to its characterized pattern in the dying cell.

Interesting observations were made by Liebalddt on *Mnium* (1938) that the darkening of chloroplast was not uniform among adjoining cells in a single piece of tissue, and even among chloroplasts of a single cell (Fig. 3). Not infrequently, darkened chloroplasts appeared in concentric zones (Fig. 4). In many cases, diffuse flocculum of silver appeared beside the darkened chloroplasts. In the leaf of *Malva moschata* (1937) such concentric zones of diffuse flocculum often appeared centred at the stomata (Figs. 1, 2). Uneven darkening around a chloroplast was also observed by Weber (1937 a) in the case of *Selaginella helvetica* (Fig. 2). These evidences suggest that the pattern of silver deposition is affected also by some condition similar to that causes the Liesegang phenomena. It is also noticeable that Lloyd (1925) observed periodic zonation and localized deposition of the precipitate in his experiment on the cytochemical detection of potassium by means of the cobalt sodium hexanitrite reagent. He criticized incautious application of precipitation reactions in attempt to decide the intracellular localization of substances.

Shinke and Shigenaga (1947) in collaboration with Iijima and Hiraoka (1950) examined the reliability of the silver reagent for detecting ascorbic acid in plant tissues. These Japanese authors carried out the model experiments using sliced pith of *Sambucus Sieboldiana* which was infiltrated with solutions of ascorbic acid. Either of the model and plant material which had higher ascorbic acid content showed more intense reduction than those with lower content. But the leaf of *Diospyros Kaki* was found to be an exceptional case in which the Molisch reaction was mostly negative in spite of remarkably high ascorbic acid content (above 300 mg.%). Apart from ascorbic acid, some other compounds also reduced silver reagent even in acid solution (pH 3 to 4). Hence, they concluded that although the silver reagent was useful for histochemical detection of ascorbic acid, its specificity and sensitivity were much lower than considered by precedent authors.

D. Surface properties

In further approach to the complexity of the Molisch reaction, surface properties and protoplasmic structures in the interior of the chloroplasts were noticed in later works of Mirimanoff (1940, 1943). Such mosses as *Mnium* and *Lithops* showed different patterns in the darkening of the

chloroplasts according to fine structures of grana and stroma. Reduction of the acid and the neutral silver reagents was observed on the surface of cystolith in *Pellionia Daveauana* in the dark as well as in the light, in accord with Molisch's earlier findings (1918 b) on the cystoliths of *Ficus*, *Urtica* and other plants. Though this reaction on cystolith might be governed by some other principles different from that of the Molisch reaction, it was known that the internal and surface structures of chloroplast and of cystolith had important bearing in the localized darkening of themselves. While the Molisch reaction turned negative in most of the cases hitherto examined when the cells were killed previously, it remained positive when a moss, *Bryum capillare*, was killed with 0.1 per cent phenylmercuric borate and was deprived of ascorbic acid by subsequent washing in water. The darkening of chloroplast in this case seemed to depend on the surface of the chloroplast rather than the presence of ascorbic acid.

Hagène (1945, 1947) and Hagène and Goas (1946, 1949 a, b) studied fluorescence phenomena in relation to the physiological state of chloroplast, in parallel with the reduction of silver nitrate. Fluorescence was found closely associated with the intactness of the chloroplast. It weakened greatly in the necrotic decay of chloroplast, whereby the Molisch reaction was also abolished. Though fluorescence and the Molisch reaction were retained in the cell of *Elodea canadensis* just killed with a half-saturated solution of thymol, both of them were lost after prolonged immersion (15 minutes) in the same solution. On the other hand, fluorescence was maintained in the chloroplast of the cells killed with liquid air whereas the Molisch reaction was entirely lost. Although either of the Molisch reaction and fluorescence was closely associated with the intactness of chloroplast, it has become implausible to consider that the two are connected directly.

E. Relation of the Molisch reaction to the function of the chloroplast

The Molisch reaction was also mentioned by several authors who considered this reaction as one of the criteria for functional activities of the chloroplast. Guilliermond (1941) noticed the appearance of this reaction in the process of development and differentiation in plant cytoplasm. Schopfer (1949) considered that the Molisch reaction might indicate an active biosynthesis of ascorbic acid in green leaves, and reviewed numerous works on this reaction. Tamiya (1943), supposing the Molisch reaction to be caused by ascorbic acid, assumed that ascorbic acid might play an essential role in the "dark fixation of carbon dioxide" in photosynthesis. Although this assumption was abandoned in his later investigations, the Molisch reaction in his view had a revived significance in photosynthetic processes. Rabinowitch (1943) also referred to the supposed role of ascorbic acid in photosynthesis. He then thought that pattern of the Molisch reaction was rather an indirect and incomplete representation of the grana-stroma structure of the chloroplast, for the reaction was only a postmortal phenomenon. Granick (1949), inclined to consider the Molisch reaction as the indication of ascorbic acid, also left it open whether ascorbic acid was localized exclusively in the chloroplast.

F. Probable colloid chemical processes in reduction and precipitation

As reviewed above, the experimental results and interpretations have often been contradictory to one another, though each of them may seem as a clue for further approach. Attention was first paid by Nagai (1950 b)

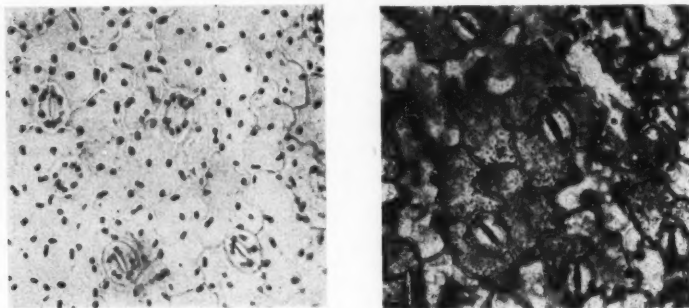


Fig. 1. The leaf of *Trifolium repens*. Lower epidermis treated with acid reagent (A), and ammoniacal reagent (B). (After Nagai 1950 b.)

on the patterns of reduction in plant cells and in newly devised models. The two patterns, the localized darkening of the chloroplast and the

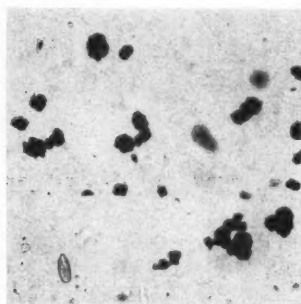


Fig. 2. Grains of aluminium hydroxide embedded in agar containing 50 mg.% of ascorbic acid. Treated with acid silver reagent. Note the localized darkening of the grains. (After Nagai 1950 b.)

(Fig. 2). But with ammoniacal (pH 8 to 9) silver reagent, dense but diffuse flocculation occurred in the matrix, instead of the darkening of grains. In spite of the parallelism between the aluminium hydroxide model and

diffuse flocculation of reduced silver in cytoplasm and vacuole, seemed to stand in close relation to each other. They appeared in reciprocal relation according to acidity and alkalinity of the silver reagent applied. In the extreme case (pH 9) the Molisch reaction was negative, dense diffuse flocculation causing the over-all darkening of the cell (Fig. 1 B)². The model experiments were carried out using fine grains (about 40 μ in diameter) of various adsorbents (aluminium hydroxide, talc, silica gel, kieselgur, acid clay) embedded in the matrix of agar which contained some sorts of reducing agents. Silver reagents (2 per cent) controlled at various pH values (2 to 9) were applied to thin slices of these agar models. When the agar containing 50 to 100 mg.% of ascorbic acid and grains of aluminium hydroxide was treated with acid (pH 4 to 5) silver reagent, the strictly localized darkening of the grains occurred (Fig. 2). But with ammoniacal (pH 8 to 9) silver reagent, dense but diffuse flocculation occurred in the matrix, instead of the darkening of grains.

² The figures in the present review are numbered in romans.

the living cell with respect to the dependence of the pattern of reaction to pH, the reaction in the model was independent of light. Hydroquinone, pyrocatechin and pyrogallol used in place of ascorbic acid also had just the similar effect, but only in much higher concentration (1 per cent). On the other hand, the patterns in plant cells were reproducible only with aluminium hydroxide, and not with silica gel and other adsorbents, the clear-cut contrast between the cases of aluminium hydroxide and of silica gel suggests that the localized darkening due to reduced silver depends upon the surface property of adsorbent grain. The difference between the conditions of living chloroplast treated in the light and in the dark might possibly correspond to the difference between different kinds of adsorbent. The growth of submicroscopic particles of silver to visible precipitate must depend on some colloid chemical processes. And it might be a certain nature of the surface of chloroplast or adsorbent that controls such colloid chemical processes.

G. Re-evaluated significance of ascorbic acid and chlorophyll

In order to determine the reducing agent which actually contributes to the Molisch reaction in the plant cell, paper partition chromatography was employed by Nagai (1951). Among several constituents developed on the paper chromatogram of minute amounts of extracts from various plant materials, ascorbic acid reduced the silver reagent most vigorously. Flavonoid compounds, tannins and reducing sugars, even though present, reduced the ammoniacal silver reagent weakly, but could not reduce the acid one at all, while ascorbic acid reduced the latter, not to speak of the former. It was noticed that dioxyphenylalanine (DOPA) contained in the leaves of *Vicia faba* and *V. sativa* was so strong in reducing capacity as to be comparable to ascorbic acid (Fig. 5). Hence it was concluded that ascorbic acid was exclusively responsible for the reduction in most cases, DOPA also being effective in some particular cases. The spot-test with 2,6-dichlorophenol-indophenol used by Weber (1939, 1949), proved to be also useful for the detection of ascorbic acid in a minute amount of the expressed sap but it is inferior to paperchromatography in specificity.

While Arasaki (1948) attempted to apply the silver reagent for histochemical detection of ascorbic acid in marine algae which had been ignored

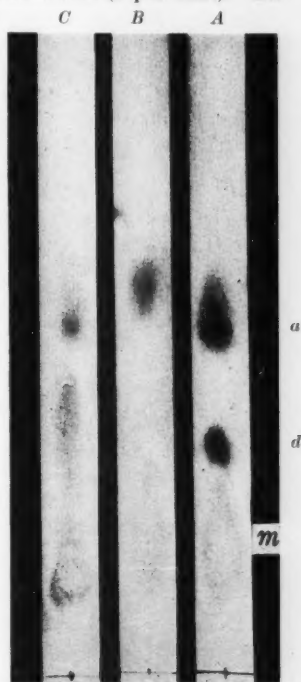


Fig. 5. Paper chromatograms of the metaphosphoric acid extract from *Vicia faba* (A), *V. sativa* (B) and *Rumex acetosa* (C), developed with butanol-acetic acid mixture, and sprayed with ammoniacal silver reagent. The spots represent ascorbic acid (a), DOPA (d) and metaphosphoric acid (m), respectively.

(After Nagai 1951.)

before, Nagai and Ogata (1952 a) examined the Molisch reaction in various algae, especially marine, with reference to ascorbic acid. Among algae tested, red algae, *Porphyra* and *Bangia* showed the Molisch reaction most conspicuously. And the intensity of the reaction was in parallel with the ascorbic acid content, just as in the case of higher land plants. Ascorbic acid was the only constituent that could reduce silver reagent on the paper chromatogram of cell extracts, such constituents as tannins and flavonoids being quite absent in most algae. An unidentifiable tannin-like substance besides ascorbic acid, was detected on the chromatogram of the extract from *Spirogyra*, but this tannin-like spot reduced silver reagent much more weakly than the latter. It is of interest in this respect that Kwiatkowski (1950) observed positive reaction in another conjugating alga, *Mesogerron fluitans*, in which tannin-like substance was almost absent. Nagai and Ogata also ascertained that oxalic acid abundantly contained in *Rumex acetosa* and *Diospyros Kaki* interfered with reduction by ascorbic acid, causing the failure of the Molisch reaction despite the high ascorbic acid content in these particular plants. The interference of oxalic acid was reproduced in the agar model containing ascorbic acid, aluminium hydroxide grains and oxalate.

In regard to the relation between the occurrence of the Molisch reaction and chlorophyll formation, Nagai and Ogata (1952 b) ascertained that the Molisch reaction altered positive in the etiolated seedlings of barley and sunflower, in which the reaction had been negative, in close relation to the chlorophyll formation, and independently of fluctuation in ascorbic acid content. Plasmolysis (cf. Furlinger 1938, *loc. cit.*), anaerobiosis, and poisoning with cyanide or monoiodoacetate similarly retarded the light-induced alteration of the Molisch reaction in these etiolated seedlings by inhibiting the chlorophyll formation. Lack of the Molisch reaction in albino plants was observed by Reuter (1938) and Mairold and Weber (1949) in spite of fairly abundant ascorbic acid content in them. A chlorophyll-poor parasite, *Cuscuta*, examined by Walzel (1952) also showed the Molisch reaction on application of Giroud's reagent. But ascorbic acid content had no definite relation to the chlorophyll content when different portions of the plant and plants of different ages were compared to one another. It was noticed by Nagai (1950 a, 1953) that the presence and absence of starch grains in the chloroplast had no direct relation to the Molisch reaction. Hiraoka (1951) observed distinct reduction of silver reagent in pollen mother cells undergoing meiosis.

Metzner (1952) compared various patterns of distribution of reduced silver particles in *Agapanthus umbellatus* and some other plants. The Molisch reaction in strict sense was observed at extremely low pH (3.0) of the reaction medium. In the intermediate pH range (up to 5.0) scattered precipitation of silver besides the darkening of chloroplast frequently occurred at chloroplast surface, grana, stroma, nucleus and sometimes even at the cell wall. And the over-all darkening of the whole cytoplasm was frequent at higher pH (8.0). The occurrence of the Molisch reaction was also in close relation to the absorption ranges of chlorophyll when the reaction was examined by means of monochromatic light. The results and interpretation of this German author on the influence of pH and the significance of chlorophyll and ascorbic acid agree fairly well

with those of the present reviewer. According to the reviewer's view, the reaction in *Agapanthus* seems to be one of the cases in which due to a high ascorbic acid content the reduction proceeds so vigorously that silver is precipitated diffusely independent of the chloroplast.

It was often discussed whether ascorbic acid is localized or much concentrated in the chloroplast (Chayen 1953). In the case of the typical Molisch reaction, one might be impressed as if ascorbic acid was strictly localized in the chloroplast. But diffuse precipitate of reduced silver frequently appeared outside the chloroplast, namely, in vacuole and cytoplasm, suggesting that ascorbic acid was also present thereabout rather evenly. In the case of model experiment by Nagai (1950 b, *loc. cit.*) using ascorbic acid, adsorbent grains and agar, the grains showed localized darkening notwithstanding that ascorbic acid was distributed entirely outside the grains. Danielli (1953) also claimed that the site of silver deposition does not necessarily indicate the localization of the reducing reaction because of highly diffusible nature of both the silver reagent and ascorbic acid. Apart from these cytochemical findings, several biochemists conducted direct determination of ascorbic acid content in isolated chloroplasts (Neish 1939; Fujimura *et al.* 1951; Jones and Hamner 1953). In each case, the fraction embracing the chloroplasts (Weier and Stocking 1952, found contamination by deformed nuclei) from homogenated leaves (*cf.* Weier 1953) had no more ascorbic acid content than other fractions. So it is mostly sure that ascorbic acid is distributed rather evenly in the whole cell.

Although the reaction of ascorbic acid to silver reagent (even the acid reagent) is not strictly specific, the Molisch reaction can be considered to indicate the presence of ascorbic acid, provided that strongly reducing constituents are not present in the tested cell. But ascorbic acid is not necessarily located concentrated in chloroplasts. The localized darkening in the Molisch reaction may depend on some surface property of the chloroplast which, in turn, is effected through photosensitization by chlorophyll.

H. Trends and prospects

At the present phase of investigation further efforts should be directed towards elucidation of the chlorophyll-sensitized acceleration of the reduction as suggested by Rabinowitch (1952) and Mirimanoff (1953). It is yet uncertain whether the photosensitization conditioning the Molisch reaction is in direct relation to photosynthetic processes. The Molisch reaction of the normal green chloroplast is not inhibited by such agents as cyanide and phenylurethane, which inhibit photosynthesis (Gautheret 1954). Such intermediates of photosynthesis as detected by recent investigations using radioactive tracers (*cf.* Calvin *et al.* 1951) do not seem to be reducing agents for themselves. But there can be a rise of reducing capacity in connexion with the course of hydrogen transfer in photosynthesis. This mechanism has been partly analysed in the Hill reaction of isolated chloroplasts. Macdowall (1952) and Gilmour *et al.* (1953) investigated the redox potential of isolated chloroplasts. Remarkable alteration, *i. e.* descending of the potential, was observed on illumination of the chloroplast preparation, indicating a rise in reducing power. And the potential previously lowered by

illumination showed a transient ascent on addition of adequate oxidizing agent. It is also suggestive that Keller (1925) formerly assumed the reduction in the Molisch reaction to be due to a cathodic polarization of the chloroplast during photosynthesis.

Recently Dyar (1953) observed interesting facts on the reduction of a tetrazolium salt to formazan (*cf.* Smith 1951, for preparation and application of this reagent) in green plant tissues (*Elodea*, spinach, and various algae). This American author applied blue tetrazolium (ditetrazolium chloride) in the light, the reduction of this reagent was remarkably localized on the surface of the chloroplast (Fig. 4A). The appearance was quite similar to the Molisch reaction, the blue precipitate of formazan formed by reduction frequently showing a grana-like fine structure.

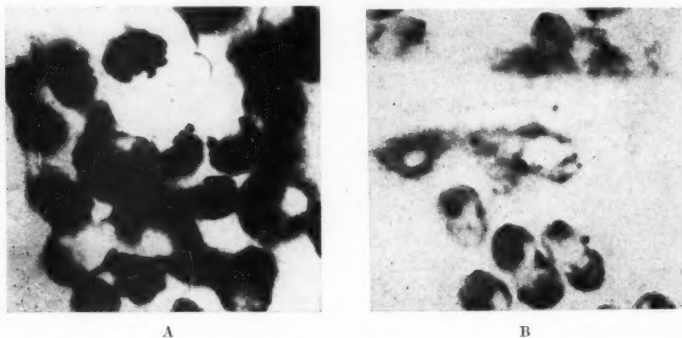


Fig. 4. Reduction of the blue tetrazolium by chloroplasts of *Elodea* in the light (A), and in the dark (B). Darkening is due to blue precipitate of formazan. (Reproduced from Dyar 1953.) By courtesy *American Journal of Botany*.

When the reagent was applied in the dark, the reduction occurred much less intensively, only a few tiny granules of precipitate appearing on the chloroplast (Fig. 4B). Tiny granules also appeared on mitochondria and leucoplasts of pea root tip. The reduction of blue tetrazolium intensified at the chloroplast, in the case of treatment in the light, was considered as a photosensitized process which might be in intimate relation to the mechanism of the Hill reaction. As blue tetrazolium can be reduced by the action of enzymes of the cyclophorase system, and can not be reduced by ascorbic acid in the medium below pH 9, it is a future problem whether there is a common mechanism in the photosensitized reductions of blue tetrazolium and of the silver reagent for the Molisch reaction.

In this connexion Ogata and Nagai (unpublished) examined the Molisch reaction in a marine red alga, *Porphyra tenera*, to utilize this reaction for discriminating intact, injured and dead states of the cell, collateral test being made using a tetrazolium salt (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride). The Molisch reaction, together with the reduction of tetrazolium, was remarkably weak in injured cells, and was entirely lost in dead ones. So it was made sure that the Molisch reaction was closely associated with the intact state of the protoplast, on which the enzyme activity reducing the tetrazolium salt depends.

In order to see significance of surface, Nagai (unpublished) studied with the leaf of *Ficus elastica* the case of silver reduction by cystolith (cf. Molisch 1918b and Mirimanoff 1940), which is chiefly composed of calcium carbonate. The cystolith did not seem to contain abundant, if any, ascorbic acid in itself. But its surface became conspicuously darkened by the treatment with silver reagent. The reaction of cystolith was not lost so rapidly as the Molisch reaction of chloroplasts in one and the same leaf section. The darkening was observed for a while even after the cell was killed. The reaction, however, was entirely lost when reduced ascorbic acid in the leaf was lost by oxidative effect of cupric ion. And the cystolith, in turn, restored its ability of darkening when the copper-treated leaf section was infiltrated with a solution of ascorbic acid prepared to approximate the concentration in the fresh leaf (40 mg.%). Grains of calcium carbonate reacted in the same way as the grains of aluminium hydroxide in the model experiment by Nagai (1950b), which is described in foregoing section. It is, therefore, most probable that the intact chloroplast in photosensitized state behaves itself in a way which is essentially the same as that of cystolith surface in causing localized darkening by metallic silver produced through the reduction by ascorbic acid.

III. Reference to the reaction in animal cells and tissues

Reduction of silver nitrate has often been observed in animal cells as well. The pattern of silver precipitation is often closely associated with such structural elements of the cell as mitochondria and the Golgi apparatus. Although the mechanism of reduction the precipitation of silver might be, at least partly, common to animal and plant cells, reactions in animal and in plant cells have sometimes been considered with much confusion. Hagène (1951) and Nagai (1952) compared the reaction in plant and animal cells, but they did not discuss on the difference in mechanisms involved in the two cases.

On various animal materials the silver reagent with improved procedures to localize and intensify the reduction has been employed for detecting substances as ascorbic acid, glutathione, and also adrenaline in particular case. Although these histo- and cytochemical methods are not yet entirely free from a certain pitfall of misleading as recently pointed out by Danielli (1953), the use of silver reagent has been advanced by Giroud and his school (*loc. cit.*), Bourne (1956), Tonutti (1958), Ries (1958) and Glick (1949).

When, on the other hand, definite reducing substances are not contained in the material, the silver deposition is made possible by artificially adding a suitable reducing agent as the "developer." The reduced silver distributes in close association with the structure of cell and tissue also in these cases, making the detailed structures (e.g. melanophores, nerve fibres, reticuloendothelial cells) accessible. The silver impregnation method has been extensively employed in histological investigations, various modifications in the procedure being devised. Historically, the impregnation method in animal tissue began in early 19th century. A little later Loew and Bokorny (1887) attempted to apply the silver reagent in plant cell (cf. Weber 1937b, and Weier, 1938 for further literature), though not so fruitful as severely criticized by Pfeffer (1889). Histochemical use

of the silver reagents in animal cell developed from the impregnation methods. Kon and his school (1933, 1938) made extensive studies in the intermediate ranges between the two, successful cases being found in various endocrine glands. The strongly alkaline (pH 9 and 12) silver reagents used by these Japanese authors were easily reduced even by cells of weak reducing capacity without addition of developer. And the pattern seemed to reflect some physiological and pathological conditions of animals and organs from which tissue preparation was sampled, *e.g.* adrenal gland in scurvy and thyroidectomy, liver in tumour, and so forth. However, cytochemical specificity of the reducing constituents was somewhat uncertain in these cases.

To say generally about the silver impregnation method, ammoniacal silver reagent, applied to the previously fixed material in the dark for most cases, yields visible precipitate of silver reduced by such agents as formalin, pyrogallol, pyrocatechin, and so forth which are used in the pre- or aftertreatment. Recent studies by Lipp (1951) on the mechanism of silver impregnation of animal tissues after the Bielschowsky-Gros method suggest that the mechanism is partly common to, and partly different from cases of plant cells, particularly the case of the Molisch reaction. According to this Austrian author, reduction of the silver reagent is initiated by the formation of submicroscopic germs (*Keimbildung*) of silver in the tissue section. The silver germs may be formed either by the photochemical action on the ammoniacal silver reagent even before use, or by the degradation of labile complex once formed in the combination of silver ions with proteins or lipoids of the preparation. By the aftertreatment with formalin, the silver reduction proceeds to make the germs develop at various specific sites in cells and tissues according to differential penetration, adsorption and retention of the silver reagent during the treatment and successive washing. The colour tone of the impregnated preparations from light brown to black depends upon the dimension (dispersity) of silver particles which grow being influenced by the above-mentioned and other factors.

In the case of the Molisch reaction caused by the acid silver reagent, the formation of silver germs and their growth to visible particles may take place in a way somewhat different from the above case where the alkaline reagent is used. Reduction in the former case is caused endogenously by ascorbic acid. The silver deposition is localized at the chloroplast, depending on the action of light. And the whole reaction is much more rapid and energetic as compared with the case of impregnation method. Although some common process might be involved in the reduction and precipitation of silver in the Molisch reaction and in the silver impregnation, the mechanism in the former is connected with photosensitization by chloroplast and reduction chiefly depends on a specific reducing agent ascorbic acid while the reduction in the latter is caused by non-specific reducing agents which are often given by additional treatment, light playing no particular role.

IV. Concluding remarks

Reduction of silver nitrate in various cells and tissues of plant and animal has been employed as a useful method in morphological and

physiological investigations. In plant cells a characteristic pattern of darkening due to reduced silver appears as a result of dynamic processes effected by ascorbic acid, light, chlorophyll, and above all, the intactness of the cell, including the chloroplast. This specific darkening of chloroplast is named "the Molisch reaction" for the sake of the eminent Austrian scholar who first noticed this reaction from the view point of cellular physiology.

Once any one of the above-named factors has been lost, soon the Molisch reaction goes in failure and becomes negative. The main feature of the Molisch reaction lies in the fact that its occurrence depends essentially upon the photosensitization mediated by chlorophyll.

The silver reagent is also reduced by such reducing substances as ascorbic acid, glutathione and adrenaline. And it is employed mainly in animal cells, for histochemical detection of these substances, without the photosensitized processes. In the histological method called "silver impregnation," the differentiated localization of reduced silver is utilized for discerning detailed structures which are otherwise unrecognizable in the cell and tissue. The reduction in this case is achieved only by an additional treatment with non-specific reducing agents.

The Molisch reaction and the "silver impregnation" may involve in common certain processes through which the reduction of silver nitrate leads to the precipitation of silver in close association with special cellular structures. For the Molisch reaction, however, some processes underlying it are possible only under a condition which is usually associated with the living state of cell.

Literature

- Arasaki, S., 1948: *Nogaku (Agronomy)* 2, 377 (Japanese).
 Bourne, G., 1936: *Anat. Rec.* 66, 369. Cited from Glick (1949).
 Calvin, M., J. A. Bassham, A. A. Benson, V. H. Bunch, C. Ouellet, L. Schou, W. Stepka, and N. E. Tolbert, 1951: Carbon Dioxide Fixation and Photosynthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* V, 284.
 Caruso, C., 1938a: *Protoplasma* 30, 341.
 — 1938b: *Protoplasma* 30, 481.
 — 1938c: *Protoplasma* 31, 98.
 — 1938d: *Protoplasma* 31, 489.
 — 1938e: *Protoplasma* 31, 489.
 Czapek, F., 1920: *Ber. dtsh. bot. Ges.* 38, 246.
 Chayen, J., 1953: Ascorbic Acid and its Intracellular Localization. *Intern. Rev. Cytology* 2.
 Danielli, J. F., 1953: *Cytochemistry*. New York.
 Dischendorfer, O., 1937: *Protoplasma* 28, 316.
 Dyar, M. T., 1953: *Amer. J. Bot.* 40, 20.
 Ertl, O., 1939: *Protoplasma* 33, 275.
 Franck, Ed. J., and W. E. Loomis: Iowa State College Press.
 Fujimura, K., Y. Hama guchi, and S. Ikeda, 1951: *Bull. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 5, 49 (Japanese).
 Furlinger, H., 1938: *Protoplasma* 30, 328.
 Gautheret, R., 1934: *C. r. Acad. Sci. Paris* 198, 1252.
 Gilmour, H. S. A., R. Lumry, and J. D. Spikes, 1953: *Plant. Physiol.* 28, 89.

- Giroud, A.: 1938: L'acide ascorbique dans la cellule et les tissus. Berlin.
- C. P. Leblond, R. Ratsimamanga, et M. Rabinowicz, 1936: *Protoplasma* 25, 115.
- Glick, D., 1949: *Techniques of Histo- and Cytochemistry*. New York.
- Granick, S., 1949: *Photosynthesis in Plants*, Chapt. 5. Ed.: J. Franck and W. E. Loomis: Iowa State College Press.
- Guilliermond, A., 1941: *The Cytoplasm of the Plant Cell*. *Chronica Botanica* Co.
- Hagène, P., 1945: *C. r. Soc. Biol.* 139, 159.
- 1947: *C. r. Acad. Sci. Paris* 225, 68.
- 1951: *C. r. Soc. Biol.* 145, 1764.
- et M. Goas, 1946: *C. r. Acad. Sci. Paris* 223, 255.
- — 1949 a: *C. r. Soc. Biol.* 143, 147.
- — 1949 b: *Rev. gen. Bot.* 56, 429.
- Hamdallah, A., 1939: *Protoplasma* 32, 31.
- Hiraoka, T., 1951: *Bot. Mag. Tokyo* 64, 101.
- Höfler, R., 1939: *Protoplasma* 33, 258.
- Iijima, M., and T. Hiraoka, 1950: *Bot. Mag. Tokyo* 63, 278 (Japanese).
- Jones, R. W., and K. Hamner, 1953: *Plant Physiol.* 28, 314.
- Keller, R., 1925: *Die Elektrizität in der Zelle*. 2. Aufl., Mährisch-Ostrau.
- Kon, Y., 1933: *Über die Silberreaktion der Zellen*. Jena.
- and K. Takeda, 1938: *The Silver Reaction and Histochemistry of Endocrine Glands*. Tokyo (Japanese).
- Kwiatkowski, G., 1950: *Protoplasma* 39, 289.
- Lepeschkin, W. W., 1934 a: *Protoplasma* 20, 232.
- 1934 b: *Protoplasma* 21, 594.
- 1935: *Protoplasma* 22, 561.
- Liebalddt, E., 1937: *Protoplasma* 27, 264.
- 1938: *Protoplasma* 31, 267.
- Linsbauer, K., 1926: *Planta* 2, 530.
- Lipp, W., 1951: *Protoplasma* 40, 275.
- Lloyd, F. E., 1925: *Flora* 118, 369.
- Loew, O., und T. Bokorny, 1887: *Bot. Ztg.* 45, 849.
- Mairold, F., und F. Weber, 1950: *Protoplasma* 39, 275.
- Macdowall, F. D. H., 1952: *Science* 116, 398.
- Metzner, H., 1952: *Protoplasma* 41, 129.
- Mirimanoff, A., 1938 a: *Rev. Cytol. Cytophysiol. Veget.* 3, 119.
- 1938 b: *Protoplasma* 33, 211.
- 1938 c: *C. r. Acad. Sci. Paris* 206, 766.
- 1938 d: *C. r. Acad. Sci. Paris* 206, 1038.
- 1938 e: *Rev. gen. Bot.* 50, 333.
- 1939: *Rev. gen. Bot.* 51, 133.
- 1940: *Bull. Soc. Bot. Genève* 30, 1.
- 1943: *C. r. Soc. Sci. Phys. Hist. Nat. Genève* 60, 105.
- 1953: Personal communication.
- Molisch, H., 1918 a: *Sber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., 1. Abt.* 127, 449.
- 1918 b: *Ber. dtsh. bot. Ges.* 36, 474.
- 1921: *Ber. dtsh. bot. Ges.* 39, 136.
- Nagai, S., 1950 a: *Bot. Mag. Tokyo* 63, 250 (Japanese).
- 1950 b: *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. D 1*, 33 (abstracted by O. Härtel:

- Protoplasma 41, 546, 1952).
- 1951: J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. 2, 1 (abstracted: by O. Härtel: Protoplasma 41, 546, 1952; 42, 491, 1953).
 - 1952: Seibutsu-kagaku (Biological Science) 4, 73 (Japanese).
 - 1953: J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. D 4, 27.
 - and E. Ogata, 1952 a: J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. 3, 37 (abstracted: Protoplasma 42, 491, 1953).
 - 1952 b: J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. 3, 46 (abstracted: Protoplasma 42, 491, 1953).
 - Neish, A. C., 1939: Biochem. J. 33, 330.
 - Neubauer, M., 1939: Protoplasma 33, 258.
 - Pekarek, J., 1938: Protoplasma 30, 534.
 - Pfeffer, W., 1889: Flora 47, 46.
 - Rabinowitch, E. I., 1945: Photosynthesis and Related Processes I. New York.
 - 1952: Ann. Rev. Plant Physiol. 3, 229.
 - Reuter, L., 1938: Protoplasma 31, 147.
 - Ries, E., 1938: Grundriß der Histophysiologie. Leipzig.
 - Savelli, R., und C. Caruso, 1939 a: Protoplasma 32, 397.
 - — 1939 b: Protoplasma 32, 517.
 - Schopfer, W. H., 1949: The Plants and Vitamins. Chronica Botanica Co.
 - Shinke, N., and M. Shigenaga, 1947: Rep. 74 Div. Sci. Res. Council (Japanese).
 - Smith, F. E., 1951: Science 113, 751.
 - Tamiya, H., 1943: Mechanism of Photosynthesis. Tokyo (Japanese).
 - Tonutti, E., 1938: Protoplasma 31, 151.
 - Walzel, G., 1952: Protoplasma 41, 260.
 - Weber, F., 1937 a: Protoplasma 28, 283.
 - 1937 b: Protoplasma 29, 427.
 - 1938: Protoplasma 31, 289.
 - 1939: Protoplasma 33, 474.
 - 1949: Protoplasma 39, 113.
 - Weier, T. E., 1938: Amer. J. Bot. 25, 501.
 - 1953: Protoplasma 42, 260.
 - and C. R. Stocking, 1952: Amer. J. Bot. 39, 720.

Kurze Mitteilungen

„Elaioplasten“ fehlen den Schließzellen von *Hosta plantaginea*

Von

Friedl Weber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 15. September 1954)

Wakker (1888) hat in den Epidermiszellen des Laubblattes von *Vanilla planifolia* bis dahin nicht bekannte Inthaltskörper gefunden, die Öl in einem eiweißreichen „Stroma“ enthalten; er bezeichnete sie als Elaioplasten. Sie sind nur in jungen Blättern vorhanden, erreichen dort die ungefähre Größe des Zellkerns, nehmen mit dem Alterwerden der Blätter an Volumen ab und verschwinden schließlich ganz. Mit diesen Körpern identische Gebilde fand dann Zimmermann (1893) in der Korollen-Epidermis von *Funkia lancifolia*, *F. coerulea* und *F. Sieboldiana*. Später wurden solche Elaioplasten auch noch in anderen Pflanzen gefunden (Lit. bei Meyer, 1920, Molisch, 1923, Linsbauer, 1930). Ihre Verbreitung erscheint aber — wie Molisch sagt — immerhin beschränkt.

Bei Untersuchung der Korollen-Epidermis von *Hosta plantaginea* (aus dem Botanischen Garten der Universität Graz) fiel in jeder Zelle ein ansehnlicher, granulärer Inthaltskörper auf, der sich in seinen Reaktionen durchaus so verhielt wie die Elaioplasten von Wakker. Es ist mir aus der Literatur nicht bekannt, ob auch für diese *Hosta*- (*Funkia*-) Spezies Elaioplasten schon beschrieben worden sind. Was in dieser kurzen Mitteilung hervorgehoben werden soll, ist lediglich die Beobachtung, daß im Gegensatz zu den übrigen Epidermiszellen in den Schließzellen der Stomata die Elaioplasten bzw. die aus ihnen austretenden Öltropfen stark orange-rot gefärbt hervortreten. Zimmermann empfiehlt zur deutlichen Sichtbarmachung auch kleiner Ölkörper die Behandlung mit Osmiumsäure. Die Elaioplasten nehmen dabei „fast momentan eine intensive Braunfärbung an. Es war so ein Übersehen der Elaioplasten ausgeschlossen“. Auch bei

Einwirkung von Osmiumsäure waren jedoch in den Schließzellen von *Hosta plantaginea* Elaioplasten nicht nachzuweisen.

Die Stomatazellen, die sich durch eine Reihe positiver Eigenschaften von den übrigen Epidermiszellen unterscheiden, weisen interessanterweise diesen gegenüber auch negative Eigenschaften auf, das heißt, es fehlen ihnen vielfach Inhaltskörper, die in den gewöhnlichen Oberhautzellen vorkommen. So fehlen den Schließzellen Proteinoplasten (Thaler 1953) sowie Chromoplasten (Schittengruber 1953).

Mit der hier festgestellten Tatsache, daß den Schließzellen — wenigstens denen von *Hosta plantaginea* — auch die Elaioplasten fehlen, sollen

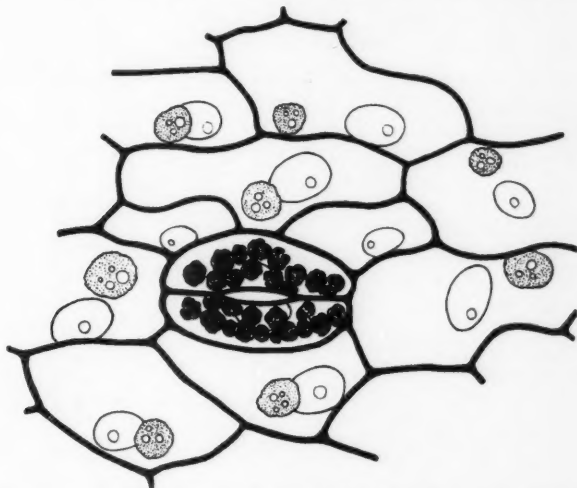


Abb. 1. Epidermis der Korolle von *Hosta plantaginea*. Elaioplasten punktiert. Zellkerne mit Nucleolus.

im übrigen diese Gebilde keineswegs auf die gleiche Stufe wie Plastiden gestellt werden, ihre Plastiden-Natur wird ja jetzt vielfach angezweifelt. Die Untersuchung dieser Elaioplasten, von den neuen Gesichtspunkten der Plastidenforschung aus, wäre sehr erwünscht, ebenso ein Vergleich mit den Plastiden von Orchideen, die nach Germ (1954) beim Zerfall ölrreiche Körper entstehen lassen.

Da Elaioplasten schon von vielen Monokotylen bekannt sind, wäre es wissenswert, ob bei allen diesen Pflanzen die Schließzellen frei von diesen Gebilden sind. Es scheint dies nicht der Fall zu sein. Wakker (1888: 480) gibt für *Vanilla planifolia* an: In den Schließzellen der Spaltöffnungen finden sich mehrere, aber viel kleinere Elaioplasten als in den übrigen Epidermiszellen. Diese Angabe konnte bestätigt werden. Von *Vanilla planifolia* ist es bekannt, daß in erwachsenen Blättern die Elaioplasten verschwinden und daß dann in jeder Epidermiszelle je einer der bekannten Calciumoxalatkrystalle auftritt, der zur Zeit der Elaioplasten noch nicht vorhanden war. Natürlich besteht, wie schon Wakker ausdrücklich hervorhebt, keine direkte Beziehung zwischen dem Verschwinden der Ölkörper

und dem Erscheinen der Caoxalatkristalle. Andererseits ist aber immerhin eine Tatsache bemerkenswert, die bisher anscheinend übersehen worden ist: Die Schließzellen und häufig auch alle oder einige Nebenzellen von *Vanilla planifolia* besitzen höchstens unscheinbare Elaioplasten und niemals (auch nicht in voll erwachsenen Blättern) Kalziumoxalatkristalle.

Zusammenfassung

Die Korollen-Epidermis von *Hosta plantaginea* besitzt in jungen Blüten in jeder Zelle je einen wohlentwickelten Elaioplasten, den Stomata-Schließzellen fehlen diese Inhaltskörper.

Literatur

- Germ, 1954: Plastidenzerfall in den Epidermiszellen von *Cephalanthera*-Arten. Protoplasma 43.
 Linsbauer, 1950: Die Epidermis. Handbuch der Pflanzenanatomie I/2. Berlin.
 Meyer, 1920: Analyse der Zelle. Jena.
 Molisch, 1923: Mikrochemie der Pflanze. III. Aufl. Jena.
 Schittengruber, 1953: Chromoplasten fehlen den Schließzellen. Protoplasma 42.
 Thaler, 1953: Proteinoplasten fehlen den Schließzellen. Protoplasma 42.
 Wakker, 1888: Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzelle. J. wiss. Bot. 19.
 Zimmermann, 1895: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle.

„Sterinoplasten“ fehlen den Schließzellen

Von

Friedl Weber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 18. September 1954)

Mirande (1923/24) fand in den Epidermiszellen der Zwiebelschuppen von *Lilium candidum* kugelige Gebilde, die er als „Sterinoplasten“ bezeichnete. Nach Reilhes (1933/34) handelt es sich bei ihnen um tropfige Ausscheidungen, die sich im Zellsaft befinden und daher die Bezeichnung „Plasten“ nicht verdienen. Diese Gebilde sollen aus Phospholipoiden (Phytosterinen) bestehen, die von einer Eiweißhülle umgeben sind (Lit. bei Dangeard 1947, Küster 1950). Da diese eigenartigen Inhaltskörper in anderen Geweben der Zwiebelschuppen nicht vorkommen, ist ihre Bildung offenbar das Ergebnis eines spezifischen Stoffwechsels der

Oberhautzellen. Die Stoma-Schließzellen, die entwicklungsgeschichtlich der Oberhaut angehören, haben vielfach einen anderen Stoffwechsel als die übrigen Epidermiszellen. Es fehlen den Schließzellen daher auch manche gelöste und feste Inhaltskörper, die in den anderen Oberhautzellen vorkommen. So sind u. a. die Schließzellen meist anthozyanfrei, sie enthalten kein Anthoorphin (Schittengruber 1953), keine Caoxalatkristalle, meist keine Eiweißkristalle (Eiweißspindeln) (Brat, Kenda, Weber 1951), keine Proteinoplasten (Thaler 1952), Chromoplasten (Schittengruber 1953), Elaioplasten (Weber 1954).

Es wurde untersucht, ob die Schließzellen der Zwiebelschuppen von *Lilium candidum* die für die anderen Epidermiszellen so charakteristischen „Sterinoplasten“ besitzen oder nicht. Die *Lilium*-Zwiebelschuppen-Epidermis enthält zwar große, gut ausgebildete, aber nur sehr wenig Stomata. Die Schließzellen sind von Plastiden erfüllt, die reichlich Stärke enthalten. Sterinoplasten sind in den Schließzellen nicht zu sehen.

Es liegt hier ein weiteres Beispiel dafür vor, daß die Schließzellen sich in ihrem Stoffwechsel und in ihren Inhaltskörpern (Salze, Glykoside, Lipochrome, Sterine, Proteine) ganz wesentlich von den anderen Epidermiszellen unterscheiden.

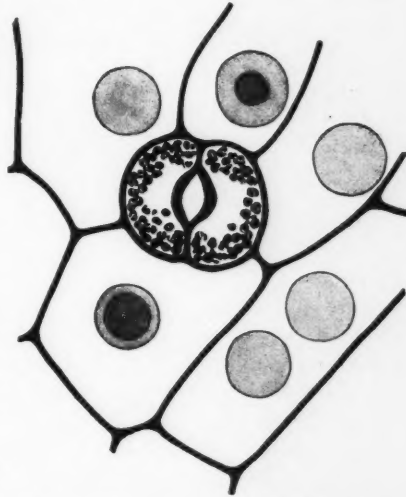


Abb. 1. *Lilium candidum*. Epidermis der Zwiebelschuppe.

Literatur

- Brat, Kenda, Weber, 1951: Rhabdoide fehlen den Schließzellen von *Drosera*. *Protoplasma* 40.
 Dangeard, 1947: *Cytologie végétale et Cytologie générale*. Paris.
 Küster, 1950: *Die Pflanzenzelle*. II. Aufl. Jena.
 Miranda, 1923: Sur les organites élaborateurs particuliers (stérinoplastes) de l'épiderme des écailles de bulbes de *Lis blanc*. *C. r. Paris* 176.
 Reilhes, 1933: Sur la nature chimique et la signification des stérinoplastes. *C. r. Soc. Biol.* 113.
 Schittengruber, 1953: Chromoplasten fehlen den Schließzellen. *Protoplasma* 42.
 — 1953: Das Anthoorphin fehlt den Schließzellen. *Protoplasma* 42.
 Thaler, 1953: Proteinoplasten fehlen den Schließzellen. *Protoplasma* 42.
 Weber, 1954: „Elaioplasten“ fehlen den Schließzellen von *Hosta plantaginea*.

Kalziumoxalatkristalle fehlen den Schließzellen

Von

Friedl Weber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 26. November 1954)

Weiß (1884) dürfte einer der ersten, wenn nicht der erste, gewesen sein, dem es auffiel, daß Kalziumoxalatkristalle in den Schließzellen des Spaltöffnungsapparates auch dann fehlen, wenn die übrigen Epidermis-

zellen solche Kristalle regelmäßig und reichlich besitzen. Als ein besonders frappantes Beispiel für diese Regel mag die Epidermis der Blattunterseite von

Cheilopsis montana gelten, deren Abbildung nach Weiß hier übernommen wird

(Abb. 1). Kohl (1889, 36) hat in seinem Buche über „Kalksalze und Kieselsäure in der Pflanze“ darauf hingewiesen, daß hinsicht-

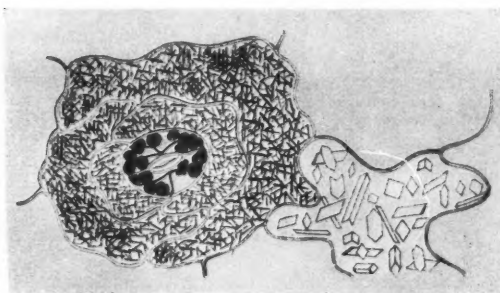


Abb. 1. *Cheilopsis montana*. Epidermis der Blattunterseite. Nach Weiss.

lich des Vorkommens von Caoxalatkristallen die Oberhaut der Pflanzen außerordentliche Verschiedenheiten aufweist: Während im allgemeinen die Epidermis frei von Kristallen ist, auch wenn die übrigen Gewebe massenhaft enthalten, so sind doch die Epidermen mancher Pflanzen geradezu angefüllt mit solchen Kristallen. Als Beispiel führt Kohl die Oberhaut vieler Acanthaceen an, worauf — wie erwähnt — schon Weiß aufmerksam gemacht hat. Kohl fügt verallgemeinernd die Bemerkung hinzu: „Die Schließzellen der Spaltöffnungen sind immer frei von Kristallen.“

Es ist überraschend, daß das Fehlen der so auffallenden Kristalle von Caoxalat in den Stomazellen späterhin offenbar kaum Beachtung gefunden hat. Es müßte allerdings erst durch umfangreiche Untersuchungen ermittelt werden, ob es sich dabei um eine Regel mit oder ohne Ausnahmen handelt. Jedenfalls ist der Mangel an Caoxalatkristallen in den Schließzellen nicht etwa auf die Acanthaceen beschränkt. Ein sehr markantes Beispiel dafür stellt die unterseitige Oberhaut des Laubblattes von *Vanilla planifolia* dar. Bei diesem Blatte „liegt in jeder Epidermiszelle ein schön geformter tetragonaler Kristall“. Kohl hat in Fig. 37 der Tafel III seines Buches eine gute Abbildung davon gebracht, stellt aber nur gewöhnliche Epidermis-

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

XLIV. BAND

MIT 243 TEXTABBILDUNGEN



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1955

L

4

S

5

11

Inhalt

Abhandlungen

	Seite
Biebl, R.: Zellwandpermeabilität einiger Moose	73
— — und Waldtraut Rossi-Pillhofer: Die Änderung der chemischen Resistenz pflanzlicher Plasmen mit dem Entwicklungszustand	113
Bierling, R.: Zur Bedeutung der lokalen Mitochondriendichte für die Formkonstanz von Zellen	299
Diskus, A.: Vitalfärbestudien an Euglenaceen.	194
Düvel, D.: Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Entwicklung der Chloroplasten	239
Flasch, Assunta: Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen	412
Grave, Gisela: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei <i>Agapanthus umbellatus</i>	273
Hagström, B., and J. Runnström: The Effect of N-Ethylmaleimide on the Fertilization of the Sea Urchin Egg	154
Heilbrunn, L. V., and W. L. Wilson: The Initiation of Cell Division in the <i>Chaetopterus</i> Egg	377
Imazumi, T.: Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. I	1
— — Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. III	22
— — et Y. Kimoto: Recherches sur l'expression des facteurs létaux héréditaires chez l'embryon de la drosophile. II	11
Johannes, H.: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien.	165
Kaja, H.: Untersuchungen über die Chromatophoren und Pyrenoide der Anthocerotales	136
Kenda, Griseldis: Eiweißspindeln in <i>Opuntia monacantha</i> f. <i>variegata</i>	192
Kinzel, H.: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften	52
Kopetzky-Rechtberg, O.: Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge <i>Netrium digitus</i> (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluß	322
Kriszat, G.: Über periodische Änderungen im Zustand der Plasmamembran und des Zytoplasmas während des Ein-Zell-Stadiums des befruchteten Seeigels	89
Lettré, H., und Annelies Schleich: Zur Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure für Formkonstanz und Formänderungen von Zellen	314
Linser, H.: Die Wuchsstoffwirksamkeit von β -Naphthoxyessigsäure und Indol-3-Essigsäure in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen	307
Luger, H.: Der Einfluß der Ascorbinsäure auf die Assimilation und Atmung höherer Pflanzen	212
Mayr, H. H.: Zur Kenntnis des osmotischen Verhaltens von Getreidewurzeln	389
Pfeiffer, H.: Vorläufige Versuche über die Elastizität des Atraktoplasmas	47
Pisek, A., und W. Larcher: Zusammenhang zwischen Austrocknungsresistenz und Frosthärte bei Immergrünen	30
Schaefer, G.: Ein Versuch zur quantitativen Auswertung der Plasmolyseform- und -zeitmethode	422
Scheidl, W.: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von <i>Tulipa silvestris</i> und <i>Colchicum speciosum</i>	336

Inhalt

Seite

Sponsler, O. L., and J. D. Bath: Some Micellar Components of <i>Physarum polycephalum</i> as Revealed by the Electron Microscope	259
— — Some Features of <i>Nitella</i> Chloroplasts as Revealed by the Electron Microscope	332
Thaler, Irmtraud: Die Leukoplasten von <i>Helleborus</i>	437
Wicklund, Elsa: On the Influence of Adenosine Triphosphate (ATP) on the Membrane Formation and the Cytoplasmic State in the Sea Urchin Egg	98
Wiede, M., und F. Meyer: Über die Toxizität einiger Fluorochrome	342
Ziegenspeck, A.: Das Vorkommen von Fila in radialer Anordnung in den Schließzellen	385
Ziegler, Magda: Untersuchungen über Wundreizreaktionen an Pflanzen	350

Sammelreferat

Nagai, S.: The Reduction of Silver Nitrate by Plant Cells, Particularly by Chloroplasts	444
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Kurze Mitteilungen

Drawert, E.: Über die Eignung zelleigener Anthocyane zur pH-Wert-Bestimmung des Zellsaftes	370
Flasch, Assunta, und H. Kinzel: Rasche Bildung von Entmischungskörpern in Zellsäften von <i>Buxus sempervirens</i>	266
Krebs, Inge: Beobachtungen über das Plasmolyseverhalten von <i>Spirotaenia condensata</i> Breb	106
Rezende-Pinto, M. de, und A. de Lemos: Über die Struktur der Chloroplasten von <i>Oedogonium</i>	468
Rieth, A., und H. A. v. Stosch: Der Kapillarheber, ein Bauelement zur Herstellung von Durchströmungspräparaten	363
Sponsler, O. L., and J. D. Bath: Numerical Aspects of Protein Molecules in <i>Escherichia coli</i>	369
Stosch, H. A. v.: Eine Kammer für mikroskopische Lebenduntersuchungen mit Trennung von Objekt und strömendem Medium	365
Weber, F.: Virus-Kristalle in <i>Lilium</i>	373
Weber, F.: „Elaioplasten“ fehlen den Schließzellen von <i>Hosta plantaginea</i>	460
Weber, F.: „Sterinoplasten“ fehlen den Schließzellen	462
Weber, F.: Kalziumoxalatkristalle fehlen den Schließzellen	464

zellen dar und erwähnt auch nichts davon, daß in den Schließzellen und gewöhnlich auch in den Nebenzellen Kalkoxalatkristalle fehlen, wie dies die Abb. 2 und 3 zeigen.

Den Physiologen interessiert die Frage, warum in den Zellen des Spaltöffnungsapparates die Caoxalatkristalle fehlen, während sie in den Zellen der Umgebung regelmäßig vorkommen. Zur Bildung dieser Kristalle müssen Kalzium und Oxalsäure zusammentreffen. Es wäre möglich, daß die Schließzellen für Kalzium impermeabel sind, dieses also nicht eindringen kann. Es liegen für manche Pflanzen Angaben darüber vor, daß die Schließzellen infolge Fehlens von Plasmodesmen von den übrigen Epidermiszellen stoffwechselphysiologisch weitgehend isoliert sind. Es müßte untersucht werden, ob dies bei den Acanthaceen, bei *Vanilla* und anderen Pflanzen mit kristalfreien Schließzellen der Fall ist; mit der verbesserten Methode des Plasmodesmen-Nachweises nach Lambert (1945) dürfte dies nicht schwer sein.

Es wäre auch möglich, daß in den Schließzellen keine Oxalsäure gebildet wird. Oxalsäure kann bei Eiweißabbau entstehen. Nach Wacker (1888) enthalten die Epidermiszellen des jungen Blattes von *Vanilla planifolia* Elaioplasten und keine Caoxalatkristalle. Beim Heranwachsen der Blätter verschwinden die Elaioplasten und in dem gleichen Entwicklungsstadium treten die Caoxalatkristalle auf. Nach Warlich (1892) findet man in einem bestimmten Alter der Blätter, daß „der Kristall stets in den Elaioplasten steckt, in noch älteren Blättern liegen beide meist dicht nebeneinander, bis schließlich der Elaioplast verschwindet“. Die Elaioplasten bestehen aus einem eiweißartigen Stroma, das mit Öl durchtränkt ist, es muß also bei dem Verschwinden des Stromas Eiweiß abgebaut werden, wobei Oxalsäure entstehen könnte. In den Schließzellen und meist auch in den Nebenzellen fehlen häufig die Elaioplasten (Weber 1954) und, wie hier dargelegt wurde, auch die Caoxalatkristalle. Es muß aber erwähnt werden, daß bei anderen *Vanilla*-Arten im Jugendstadium der Blätter in den Epidermiszellen zwar Elaioplasten vorhanden sind, bei ihrem Verschwinden aber keine Caoxalatkristalle auftreten.

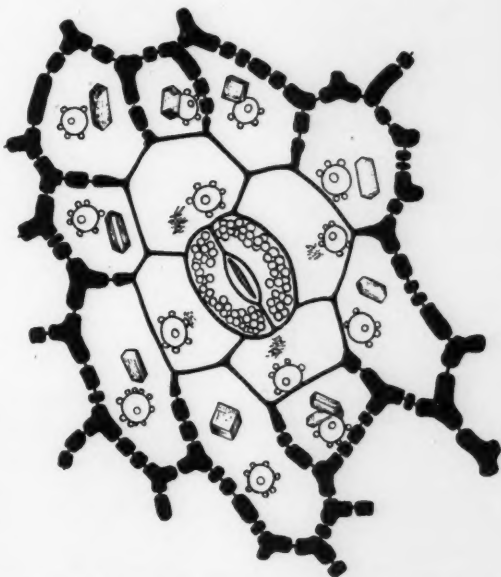


Abb. 2. *Vanilla planifolia*. Epidermis der Blattunterseite.

Kohl (1889) hat die Ansicht vertreten, daß in Zellen, deren Membranen verdickt werden, Caoxalatkristalle auftreten. Es würde also zwischen Cellulosebildung und Kristallausscheidung ein Zusammenhang bestehen. Es ist auffallend, daß in erwachsenen Blättern von *Vanilla planifolia*

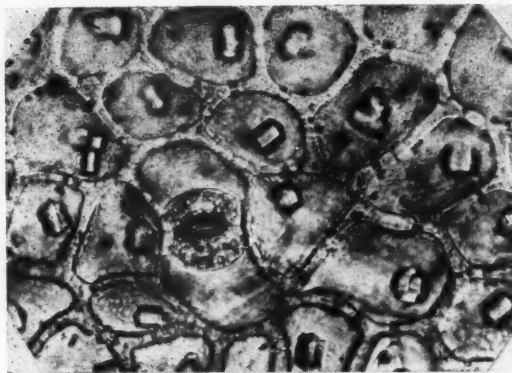


Abb. 3. *Vanilla planifolia*. Epidermis des Stengels.

für das Problem der Kristall-Idioblasten interessiert, das heißt für die Frage, warum in einem im übrigen caoxalutfreien Gewebe einzelne Zellen durch den Besitz von großen Kristallen oder Kristallaggregaten gekennzeichnet sind (Lit. bei Frey 1929, Netolitzky 1929). Das gewissermaßen umgekehrte Problem, das ist die Frage, warum in einem mit Kristallen geradezu überschwemmten Gewebe einzelne Zellen frei von Kristallen bleiben, wie eben die Schließzellen, hat dagegen — wie bereits gesagt — kaum Beachtung gefunden. Das letztere Problem hat wohl Beziehung zu einem anderen, nämlich wieso es überhaupt „Pflanzen ohne Kalkoxalat“

gibt. Schimper (1890) hat hiezu Stellung genommen und glaubt, daß an Stelle des unlöslichen, in Kristallen ausfallenden Oxalates im Zusammenhang mit den gleichen Prozessen andere, aber lösliche Kalkverbindungen mit Wein- und Apfelsäure gebildet werden. Man könnte vermuten, daß das Fehlen von Kalkoxalat-

folia zwar die gewöhnlichen Membranen Verdickungen aufweisen, nicht aber die Schließ- und Nebenzellen, und daß bei den Blättern von *Vanilla Pompona* alle Oberhautzellen relativ dünnwandig bleiben. Bei *Vanilla Pompona* bleiben alle Oberhautzellen frei von Kalziumoxalat, bei *Vanilla planifolia* nur die Zellen des Spaltöffnungsapparates.

Begreiflicherweise hat man sich zuerst



Abb. 4. *Vanilla planifolia*. Epidermis des Stengels. Gipskristalle in den gewöhnlichen Epidermiszellen nach Behandlung mit Schwefelsäure.

kristallen auch in den Stomazellen auf diese Weise bedingt ist. Es scheint dies aber nicht der Fall zu sein. Werden Epidermis-Flächenschnitte des Blattes oder Stengels von *Vanilla planifolia* in Schwefelsäure gelegt, so schießen in jeder Oberhautzelle aus dem verschwindenden Kalziumoxalatkristall Büschel von Gipskristallen hervor, in den Schließ- und Nebenzellen, in denen keine Ca-oxalatkristalle vorhanden sind, bilden sich keine Gipskristalle; solche müßten aber wohl auch in diesen Zellen entstehen, wenn sie Kalziummalat oder andere Kalksalze enthielten (Abb. 4). Molisch (1918) hat einen mikrochemischen Nachweis gelöster Oxalate im Pflanzenreiche ausgearbeitet: Freie Oxalsäure sowie leicht lösliche Oxalate geben auf Zusatz von gesättigter alkoholischer Natronlauge einen kristallinen Niederschlag, der „aus Nadelchen, Doppelpinseln, Sternen und Dendriten“ besteht. Wird z. B. ein Querschnitt durch den Blattstiel von *Begonia* mit der alkoholischen Natronlauge behandelt, so tritt sofort der Niederschlag in den Zellen auf. Das Gewebe erscheint damit wie besät. Behandelt man nun Flächenschnitte des Blattes oder Stengels von *Vanilla planifolia* mit dieser Reagens, so bildet sich keine Spur eines Niederschlages, weder in den gewöhnlichen Epidermiszellen noch in den Zellen des Spaltöffnungsapparates. Es sind also auch in diesen Zellen freie Oxalsäure oder gelöste Oxalate nicht vorhanden.

Gewiß wäre es verfrüht, auf Grund so geringen Tatsachenmaterials verallgemeinernd sich eine Vorstellung darüber bilden zu wollen, warum sich in den Schließzellen keine Kalziumoxalatkristalle bilden. Das Problem, das hiemit zur Diskussion gestellt wird, ist aber sicherlich der Beachtung wert.

Zusammenfassung

Die Schließzellen der Stomata enthalten auch dann keine Kalziumoxalatkristalle, wenn die übrigen Epidermiszellen solche Kristalle regelmäßig aufweisen. Als Beispiel für diese Regel wird die Oberhaut von Blatt und Stengel von *Vanilla planifolia* angeführt. Es wird erörtert, wodurch das Fehlen der Kalziumoxalatkristalle in den Schließzellen bedingt sein könnte.

Literatur

- Frey, 1929: Calciumoxalat-Monohydrat und Trihydrat. Linsbauer: Handbuch der Pflanzenanatomie III/1 a. Berlin.
- Frey-Wyssling, 1935: Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. Berlin.
- Kohl, 1889: Kalksalze und Kieselsäure in der Pflanze. Marburg.
- Lambertz, 1954: Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. *Planta* 44.
- Molisch, 1918: Über den mikrochemischen Nachweis und die Verbreitung gelöster Oxalate im Pflanzenreiche. *Flora* 111/112.
- Netolitzky, 1929: Die Kalksalze als Zellinhaltskörper. Linsbauer: Handbuch der Pflanzenanatomie III/1 a. Berlin.
- Schimper, 1890: Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze. *Flora* 48.
- Wakker, 1888: Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzelle. *J. wiss. Bot.* 19.

Warlich, 1892: Über Calciumoxalat in der Pflanze. Inaug. Diss. Marburg.

Weber, 1954: Elaioplasten fehlen den Schließzellen von *Hosta*. Protoplasma 44.

Weiss, 1884: Über ein eigentümliches Vorkommen von Kalkoxalatmassen in der Oberhaut der Organe einiger Acanthaceen. S.ber. k. Akad. Wiss. Wien, I. Abt. 90.

Über die Struktur der Chloroplasten von *Oedogonium*

Von

M. de Rezende-Pinto und A. de Lemos Pereira

Botanisches Institut der Universität von Porto, Portugal

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 7. Oktober 1954)

Die Chloroplasten von *Oedogonium*, deren jede Zelle einen besitzt, haben das Aussehen geöffneter Ringe, umgeben von einer Menge mehr oder weniger unregelmäßiger Poren, die ihnen das Aussehen einer Spitze oder eines Filigrans geben (Abb. 1), mit den Pyrenoiden, die sich in den Knotenregionen befinden.

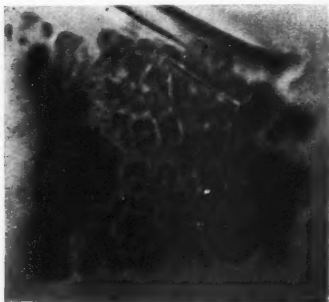


Abb. 1.

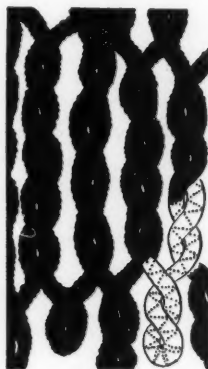


Abb. 2.



Abb. 3.

Abb. 1. Herauspräparierter intakter Chloroplast.

Abb. 2. Schema der Struktur eines Chloroplasten von *Oedogonium* sp. Der weiß dargestellte Teil zeigt die chloroplastonematische Struktur; schraubenförmiges Einrollen der Chloroplastonemata.

Abb. 3. Herauspräpariertes Chloroplastfragment, leicht gequetscht, um das helikoidale Einrollen (Pfeil) der Chloroplastonemata zu zeigen.

Innerhalb desselben Individuums wechselt ihr Aussehen außerordentlich von Zelle zu Zelle und hängt außer von anderen Faktoren von der Menge der Assimilationsprodukte ab. Wenn diese in großen Mengen vorkommen, verhindern sie völlig die Beobachtungen über die Struktur, was übrigens auch bei beliebigen anderen Pflanzen der Fall ist. Daher ist es ratsam, etiolierte Pflanzen zu benützen, d. h. hungernde Pflanzen.

In diesem Stadium wird nicht nur die Beobachtung des Chloroplasten „in situ“ leichter, sondern auch das Herausziehen desselben aus der Zelle, ohne sein wirkliches Aussehen augenscheinlich zu verändern (Abb. 1).

Auf Grund der Beobachtung des freigelegten Chloroplasten konnten wir so genau wie möglich seine komplizierte Struktur beobachten, diese entfernt sich nicht von dem von uns entworfenen Schema (Abb. 2).

So schien es uns, daß jeder Chloroplast von einem oder mehreren mehr oder wenig fadenförmigen Bändern zusammengesetzt sei, zylindrisch, um sich selbst gerollt oder die einen auf den anderen, wie es Abb. 2 zeigt. Je nachdem diese Einrollung mehr oder weniger schlaff ist, sind auch die Poren größer oder kleiner.

Jeder dieser Fäden ist dem fadenartigen Chloroplasten mancher Algen homolog, z. B. dem von *Spirogyra*, *Mougeotia* usw., und ist ebenso aus einem farblosen Stützpfeiler (=Stroma) aufgebaut, um welchen sich schraubenförmig eingerollt die Chloroplastonemata befinden (vgl. de Rezende-Pinto 1948, 1949, 1952 a, b, c; Lemos Pereira 1953), wie es aus der Mikrophotographie (Abb. 3) und aus dem Schema der Abb. 2 hervorgeht.

Literatur

- Rezende-Pinto, M. C. de, 1948: Portug. Acta Biol. (A), 2, 111—114.
— 1949: Portug. Acta Biol. (A), 2, 367—368.
— 1952 a: Protoplasma, 41, 336—342.
— 1952 b: Portug. Acta Biol. (A), 3, 281—285.
— 1952 c: Genetica Iberica, 4, 63—65.
Lemos-Pereira, Alice de, 1953: Portug. Acta Biol. (A), 3, 335—338.

Referate

Bartels, P. : Quantitative mikrospektroskopische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse akridinorangegefärbter Zellen. *Planta* 44 (1954), S. 341—369.

Eine im experimentellen Teil sehr präzise durchgeführte Arbeit. In einer erstaunlichen Arbeitsleistung hat der Autor erstmalig wirklich exakte Werte für die Konzentration von Akridinorange im Zellsaft der Innenepidermen von *Allium cepa* in Abhängigkeit von pH, Außenkonzentration und Zeit ermittelt. Er findet, daß die Speicherung des Farbstoffes in der Vakuole bei pH 6,5 einsetzt (was bereits durch die Untersuchungen von Strugger und Höfler bekannt war) und dann rasch ihrem Maximum zustrebt, das bei pH 8 erreicht wird. Neu und interessant ist der Befund, daß die Innenkonzentration, unter sonst gleichen Bedingungen, linear mit der Außenkonzentration ansteigt, daß also das Verhältnis Innen- zu Außenkonzentration im Gleichgewicht (Speicherungsfaktor σ nach Bartels) mit erstaunlicher Genauigkeit konstant bleibt. Für den zeitlichen Verlauf des Speichervorganges findet Bartels zunächst einen linearen Anstieg der Innenkonzentration, der später umbiegt und sich asymptotisch der Gleichgewichtskonzentration nähert, die nach etwa 15 Minuten erreicht wird.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse geschieht leider von einseitigen Gesichtspunkten aus. Die umfangreichen Arbeiten von Drawert über die pH-Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme wurden ignoriert. Für Bartels ist die Vakuole ein mit einer kolloiden Lösung gefüllter Raum, der durch eine ionenpermeable und nur für Kolloide impermeable Membran von der Außenlösung getrennt ist. (Für die Ionenpermeabilität des Plasmas beruft sich der Autor auf Strugger, wobei leider Permeabilität und Intransibilität verwechselt wird.) In diesem System soll nun ein Ionenaustausch stattfinden, indem H-Ionen aus dem Zellsaft gegen Farbkationen aus der Außenlösung ausgetauscht werden, die dann zum Teil an die Vakuolenkolloide adsorbiert werden. Nun wäre an einem solcherart konstruierten System tatsächlich ein Speicherungsgradient mit steigendem pH-Wert zu erwarten. Eine Fülle von anderen, aus der Literatur der letzten Jahre bekannten Versuchen (vor allem von Drawert, Strugger und aus der Höfler'schen Schule) zeigen jedoch eindeutig, daß das System, das Bartels vorschwebt, nicht dem entspricht, das in einer lebenden Zelle tatsächlich vorliegt, daß vielmehr ein basischer Farbstoff nur in demjenigen pH-Bereich permeieren kann, in dem er zu einem nennenswerten Anteil als undissoziierte Base vorliegt, die auf Grund ihrer leichten Lipidlöslichkeit auf dem Lipoidweg durch das Plasma gelangt. Auf Grund dieser Befunde hat Höfler seine Ionenfallenvorstellung aufgestellt. Die Behauptung von Bartels, daß sich die beobachtete Abhängigkeit der Gesamtinnenkonzentration von der Außenkonzentration nicht ohne Zwang mit der Ionenfallenfunktion in Einklang bringen läßt, ist nicht richtig. Der Ref. hat in einer kürzlich erschienenen Arbeit (*Protoplasma* 44, 52) die Speicherungs-gleichgewichte berechnet, die auf Grund der Ionenfallenvirkung zu erwarten

wären. Die dort vorgelegte Theorie fordert nicht nur ebenfalls eine Konstanz des Speicherungsgrades (entspricht dem Bartelschen Speichermassfaktor), sondern ist auch in anderen Punkten mit den Beobachtungen von Bartels in guter Übereinstimmung. Die Kurve der pH-Abhängigkeit der Vakuolenspeicherung verläuft nach Bartels etwas steiler, als nach der Ionenfallentheorie zu erwarten wäre. Das mag darauf zurückzuführen sein, daß die Ionenfallwirkung sekundär von einem Adsorptionsgleichgewicht an Vakuolenkolloide überlagert wird. Schwer verständlich ist lediglich der Abfall der Speicherung oberhalb von pH 8, der mit einer größeren Zahl von experimentellen Erfahrungen nicht im Einklang ist.

Bemerkenswert ist Bartels' Ansatz zur Berechnung der Permeationskonstante für den hier vorliegenden Fall, daß die Gesamtionenkonzentration des permeierenden Stoffes infolge sekundärer Vorgänge weit über die Außenkonzentration steigt. Doch müßte natürlich auch hier berücksichtigt werden, daß nicht der gesamte, sondern nur der als undissoziierte Farbbase vorliegende Farbstoff am Permeationsvorgang teilnimmt und daß die Speicherung primär auf einer Ionenfallwirkung beruht.

H. Kinzel, Wien.

Heitz, E.: Kristallgitterstruktur des Granum junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Expt. Cell Res. 7, 606—608; 1954.

An Dünnschnitten wird in den Grana junger Chloroplasten einer *Chlorophytum*-Art elektronenmikroskopisch eine deutliche Kristallgitterstruktur beobachtet und durch zwei schöne Aufnahmen belegt. Während die Grana älterer Chloroplasten immer eine Lamellenstruktur aufweisen, bestehen die Grana junger Chloroplasten aus einem oder mehreren aneinandersitzenden Kristallen. Heitz nimmt an, daß das Chlorophyll zuerst im Stroma gebildet wird — da anfangs das ganze Chlorophyllkorn fluoresziert — und daß es bei größerer Konzentration durch Kristallisation zur Bildung der Grana kommt. Er vergleicht diesen Vorgang mit der Stärkebildung aus Zucker.

I. Thaler (Graz).

Hoffmann-Ostenhof, Otto: Enzymologie. Eine Darstellung für Chemiker, Biologen und Mediziner. 44 Textabb. XVI, 772 S. Wien: Springer-Verlag 1954. Ganzl. S 670.—, DM 112.—, \$ 26.65, sfr. 114.60.

Lehrbücher der Enzymologie sind in der Regel nur für Chemiker geschrieben und oft auch nur für diese verständlich. Der Biologe findet dann darin nicht immer das, was er sucht und was er braucht. Das umfang- und inhaltsreiche Werk von Hoffmann-Ostenhof vermeidet in vorbildlicher Weise diese Einseitigkeit, es ist von biologischem Geiste ganz durchdrungen und bietet daher auch dem Biologen, ob er nun Mediziner, Zoologe, Botaniker oder Bakteriologe ist, weit mehr als irgendein anderes ähnliches Werk. Überall ist die ungeheure Literatur bis nahe an das Erscheinungsjahr gewissenhaft und eingehend berücksichtigt und zitiert. Die Darstellung und Gliederung des riesigen Stoffes ist äußerst gelungen und dadurch auch die Gefahr beseitigt, daß sich der Leser auf dem weiten und weitverzweigten Areal verirrt. Der Rahmen des Buches ist groß gezogen, und bei weiteren Auflagen werden sich leicht Einfügungen machen lassen, so etwa über das Thema „The Enzymology of the Cell-Surface“, das soeben im Handbuch „Protoplasmatologia“ von Rothstein eine zusammenfassende Darstellung erfahren hat.

F. Weber (Graz).

Leyon, H.: The structure of chloroplasts. VI. The origin of the chloroplast laminae. Expt. Cell Res. 7, 609—611; 1954.

Bemerkenswert ist, daß auch Leyon sich in dieser Arbeit mit dem submikroskopischen Bau der Grana junger Chloroplasten beschäftigt und zu

demselben Ergebnis wie Heitz kommt. Die ausgezeichneten Mikroaufnahmen zeigen in einem Proplastid von *Aspidistra elatior* die deutliche Lamellenstruktur des Stromas und in der Mitte die Kristallgitterstruktur des Primärgranum.
I. Thaler (Graz).

Leyon, H., und D. v. Wettstein: Der Chromatophoren-Feinbau bei den Phaeophyceen. Ztschr. f. Naturf. 9 b, 471—473; 1954.

Es wurde der submikroskopische Feinbau der Chromatophoren in den Eizellen, in den Zellen des Vegetationspunktes und in den Rindenzellen des Thallus von *Fucus vesiculosus* analysiert. In der Eizelle und im Vegetationspunkt sind die Chromatophoren spindelförmig, $1,4\mu$ bis $3,5\mu$ groß und werden von acht bis zehn groben Lamellen ($37 \pm 8m\mu$), die wiederum aus je vier feinen Lamellen zusammengesetzt sind, durchzogen. Die äußersten Groblamellen biegen an den Enden des Chromatophors um. Von den Chromatophoren des Eies zu denen der älteren Zellen findet man alle Übergänge. Die Plastiden der Rindenzellen sind größer und bestehen aus größeren Lamellen, die sehr locker angeordnet sind. Es scheint eine Längsteilung der Lamellen in der Mitte des Chromatophors einzutreten, die nicht ganz an die beiden Enden fortschreitet. Die Struktur der Chromatophoren der Fucaceen ist der Plastidenstruktur der Phanerogamen nicht gleichzusetzen. Seitlich oder an der Spitze der Chromatophoren wurden noch Zellorganellen beobachtet, deren Feinstruktur an die der Mitochondrien erinnert. Ausgezeichnete elektronenmikroskopische Bilder geben eine gute Vorstellung des geschilderten Feinbaues.
I. Thaler (Graz).

Strugger, S.: Über die Struktur der Proplastiden. Forschungsberichte des Wirtschafts- und Verkehrsministeriums Nordrhein-Westfalen Nr. 83. 27 S., 1 Tafel, 6 Abb. im Text. Köln und Opladen: Westdeutscher Verlag 1954.

Die Kontinuitätslehre von Schimper besagt, daß die Plastiden niemals de novo entstehen, daß sie vielmehr Zellorgane sui generis sind, die sich schon in der embryonalen Zelle in der Form von Vorstadien finden. Dieser klassischen Auffassung stand die neuere der französischen Schule vom chondriosomalen Ursprung der Plastiden gegenüber. Die Untersuchungen von Strugger und seiner Schüler haben die Entscheidung in dieser Frage im Sinne der Lehre Schimpers gebracht. Zunächst wurde durch sorgfältigste Lebendbeobachtung und durch das Studium in geeigneter Weise fixierter Zellen die Unterscheidung zwischen Proplastiden und Chondriosomen ermöglicht. Im Stroma der Proplastiden ließ sich stets ein primäres Granum feststellen, das den Chondriosomen durchwegs fehlt. Das primäre Granum ist ein kontinuierliches System des Plastids, das zur Teilung befähigt ist. Diese Befunde wurden zunächst an den Plastiden von *Agapanthus* ermittelt, bei ihrer großen Wichtigkeit war es sehr erwünscht, die Untersuchungen auf die Plastiden auch anderer Pflanzen auszudehnen. Strugger fand nun in *Chlorophytum comosum* ein für solche Studien besonders günstiges Untersuchungsobjekt. Besser noch als die bisher vorgenommene Fixierung mit Osmiumsäure erwies sich bei *Chlorophytum* eine Fixation nach Lewitzky. Der Bau der Proplastiden von *Chlorophytum* und ihr Teilungsmodus erwies sich als identisch mit dem der Proplastiden von *Agapanthus*. Dadurch erhielt die Vorstellung von Strugger eine wichtige Bestätigung und erweiterte Fundierung. Dadurch wurde auch eine kritische Stellungnahme zu der Ansicht von Heitz und Maly ermöglicht.
F. Weber (Graz).

Kurze Mitteilungen

Weber, F.: „Elaioplasten“ fehlen den Schließzellen von <i>Hosta plantaginea</i>	460
Weber, F.: „Sterinoplasten“ fehlen den Schließzellen	462
Weber, F.: Kalziumoxalatkristalle fehlen den Schließzellen	464
Rezende-Pinto, M. de und A. de Lemos Pereira: Über die Struktur der Chloroplasten von <i>Oedogonium</i>	468

<u>Referate</u>	470
---------------------------	-----

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Kaunat, H.: Die Wirkung von Antibiotika auf <i>Paramecium caudatum</i>	20. 12. 1954
Böing, J.: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Chloroplasten von <i>Helodea densa</i>	8. 1. 1955
Currier, H. B., and W. van der Zweep: Plasmolysis and the Tetrazolium Reaction in <i>Anacharis canadensis</i>	8. 1. 1955
Kinzel, H.: Zur Kausalfolge der Zellwand-Fluorochromierung mit Akridinorange	17. 1. 1955
Kiermayer, O.: Ringförmige Zellinhaltkörper bei <i>Spirogyra maxima</i>	20. 1. 1955
Frey-Wyssling, A., F. Ruch und X. Berger: Monotrope Plastiden-Metamorphose	31. 1. 1955
Baumeister, W.: Über den Einfluß des Zinks auf das Pflanzenwachstum	8. 2. 1955
Hagedorn, H.: Untersuchungen über den isoelektrischen Punkt bei Actinomycceten	14. 2. 1955
Diskus, A.: Färbestudien an den Schleinkörperchen und Schleimausscheidungen einiger Euglenen	1. 3. 1955
Pfeiffer, H. H.: Quantitative Versuche über das Fadenziehvermögen von Fibroblasten	4. 3. 1955
Erdmann, K.: Versuche zur Aufhebung der koagulierenden Wirkungen von ultraviolettem Licht und von Röntgenstrahlen auf Euglobulin mit Strahlenschutzstoffen	14. 3. 1955
Amelunxen, F.: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceae	18. 3. 1955
Kinzel, H.: Ein einfaches Mikrokolorimeter	19. 3. 1955
Höfler, K., und H. Schindler: Volle und leere Zellsäfte bei Algen	28. 3. 1955
Fasse-Franzisket, Ursula: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei <i>Agapanthus umbellatus</i> L'Hérit	1. 4. 1955
Badenhuizen, N. P.: The Structure of the Starch Granule	13. 4. 1955
Amelunxen, F.: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der Cactaceae	19. 4. 1955

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

Österreichische Zoologische Zeitschrift

Begründet von Otto Storch

Herausgegeben von

L. K. Böhm, Wien — A. Hafferl, Graz — H. Hayek, Wien — W. Kühnelt, Wien —
F. Mainx, Wien — W. Marinelli, Wien — V. Patzelt, Wien — E. Reisinger, Graz —
G. Sauter, Innsbruck — R. Schubert-Soldern, Wien — O. Steinböck, Innsbruck —
J. Strouhal, Wien

Schriftleitung: W. Marinelli, Wien

Zuletzt erschien:

Band 5, Heft 3. (Abgeschlossen im Dezember 1954.) Mit 75 Text-
abbildungen. 152 Seiten. 1954. S 198.—, DM 33.—, \$ 7.85, sfr. 33.70

Inhaltsverzeichnis: Abhandlungen. **Bejsovec, J.:** Ossifikation des Schildknorpels beim Reh-
wilde. — **Bernhauser, A.:** Über die Knochenstruktur einiger Vögel. — **Brehm, V.:** Süß-
wasser-Entomotracheen aus Cambodja. — **Janetschek, H.:** Über mitteleuropäische Felsen-
springer (Ins., Thysanura). — **Kirschhofer, Roal:** Ökologie und Revierverhältnisse beim
Schriftbarsch (*Serranus scriba* Cuv.). — **Schubart, O.:** Über einige von Professor Janetschek
in der hochalpinen Region der Dauphiné gesammelte Diplopoden. — **Solé, A.:** Ver-
gleichende Stagoskopie des Bluteserums. — **Thenius, E.:** Zur Abstammung der Rotwölfe
(Gattung *Cuon* Hodgson). — Buchbesprechungen.

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Unter Mitwirkung hervorragender in- und ausländischer Fachleute

herausgegeben von

C. Hallauer
Bern

K. F. Meyer
San Francisco

E. G. Nauck
Hamburg

Zuletzt erschien:

Band 6, Heft 1. (Abgeschlossen im Dezember 1954.) Mit 34 Text-
abbildungen. 91 Seiten. 1955. S 108.—, DM 18.—, \$ 4.30, sfr. 18.50

Inhaltsverzeichnis: **Behr, L.:** Die Gelbfleckigkeit des Spinates. — **Archetti, I.:** Appearances
Associated with Filamentous Forms of Influenza Viruses. — **Klöne, W.:** Untersuchungen
zur Cytopathogenität des Poliomyelitisvirus (Typ Leon). — **Kjellén, L.:** Studies on an Un-
identified Group of Cytopathic Agents. — **Kret, A.:** Virological Diagnosis of Poliomyelitis by
Means of a Simplified Technique for the Propagation of the Virus in Cultures of Strain
HeLa Human Epithelial Cells. — **Brand, G., und H. Lippelt:** Untersuchungen über den
unspezifischen Wassermann-Antikörper bei Ornithose. — **Lippelt, H., und F. Müller:**
Untersuchungen zum Problem der Mumpsimmunität.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

